ZUR BIOLOGISCHEN PERSISTENZ VON SULFONIERTEN AROMATISCHEN KOHLENWASSERSTOFFEN: DESULFONIERUNG UND KATABOLISMUS DER NAPHTHALIN-2-SULFONSÄURE

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt
von
WILHELM BECKMANN
aus Clausthal-Zellerfeld

Göttingen 1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534921_0025

ZUR BIOLOGISCHEN PERSISTENZ VON SULFONIERTEN AROMATISCHEN KOHLENWASSERSTOFFEN: DESULFONIERUNG UND KATABOLISMUS DER NAPHTHALIN-2-SULFONSÄURE

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt
von
WILHELM BECKMANN
aus Clausthal-Zellerfeld

Göttingen 1976

Diese Arbeit wurde im
Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen
durchgeführt.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Professor Dr. H. J. Knackmuss
Korreferent: Professor Dr. H. G. Schlegel
Tag der mündlichen Prüfung: 12. 2. 1976

Für H.

Abkürzungen

ABS	Alkylbenzenesulfonates
BSB	Biochemischer Sauerstoffbedarf
CD	Circular dichroism
DC	Dünnschichtchromatographie
DHNC	1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuclease
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid
HPLC	High pressure liquid chromatography
LAS	Linear alkylbenzenesulfonates
IR	Infrarot
NAD(H)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
NADP(H)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduziert)
NC-2	Naphthalin-2-carbonsäure
NMR	Nuclear magnetic resonance
NS-1	Naphthalin-1-sulfonsäure
NS-2	Naphthalin-2-sulfonsäure
PHB	Poly-β-hydroxybuttersäure
TOC	Total organic carbon
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
upm	Umdrehungen pro Min.
UV	Ultraviolett

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	METHODEN	4
3.	EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	25
3.1.	Anreicherung und Isolierung Naphthalin-2-sulfonsäure-abbauender Bakterien	25
3.1.1.	Direkte Isolierung mit Naphthalin-2-sulfonsäure als Substrat	25
3.1.2.	Isolierung von Naphthalin-2-sulfonsäure-Verwertern nach Voranreicherung auf Naphthalin	26
3.1.3.	Verwertung von Naphthalin-1-sulfonsäure und Versuche zum Cometabolismus von Naphthalindisulfonsäuren	28
3.1.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse der Anreicherungsexperimente	33
3.2.	Charakterisierung der isolierten Mikroorganismen	34
3.2.1.	Beschreibung der neu isolierten Bakterienstämme	34
3.2.2.	Bestimmung der Hauptgruppenmerkmale	35
3.2.3.	Untersuchungen zur Substratverwertung	37
3.2.4.	Vergleich der isolierten Stämme mit anderen Pseudomonaden	37
3.2.5.	Wachstumsversuche auf weiteren organischen Verbindungen	44
3.2.6.	Zusammenfassende Charakterisierung der neu isolierten Mikroorganismen	44
3.3.	Untersuchungen zum Katabolismus der Naphthalin-2-sulfonsäure	46
3.3.1.	Optimierung und Charakterisierung des Wachstums auf Naphthalin-2-sulfonsäure	46
3.3.2.	Isolierung und Identifizierung von Metaboliten bei Umsatz von Naphthalin-2-sulfonsäure durch die neu isolierten Bakterienstämme	49
3.3.2.1.	Charakterisierung nichtazider Metabolite	51
3.3.2.2.	Beschreibung der aziden Metabolite	56
3.3.3.	Enzymatische Untersuchungen zur Metapyrokatechase- und Gentisinsäureoxygenase-Aktivität in Naphthalin-2-sulfonsäure-verwertenden Bakterien	61

Seite

3.3.4. Bestimmung von Sauerstoffaufnahmeraten beim Umsatz von Metaboliten des Naphthalin-2-sulfonsäure-Abbaus 63

3.3.5. Zusammenfassung der Untersuchungen zum Abbauweg der Naphthalin-2-sulfonsäure 67

3.4. Untersuchungen zur Heterolyse der Kohlenstoff-Schwefel-Bindung 67

3.4.1. Versuche zur Desulfonierung bei Pseudomonas sp. A 1 68

3.4.2. Experimente zur oxygenolytischen Sulfonsäure-Eliminierung bei Pseudomonas testosteroni A 3 68

3.4.2.1. Manometrische Messungen zur Induktion des ersten Abbauenzymes 69

3.4.2.2. Versuche zur Hemmbarkeit des Naphthalin-2-sulfonsäure-Umsatzes 70

3.4.2.3. Das Cooxidationsprodukt der Naphthalin-2-carbonsäure 75

3.4.3. Zusammenfassung der Ergebnisse zur Desulfonierung von Naphthalin-2-sulfonsäure 88

4. DISKUSSION 89

5. ZUSAMMENFASSUNG 109

6. LITERATURVERZEICHNIS 112

7. ANHANG

1. EINLEITUNG

Die chemische Industrie synthetisiert eine Vielzahl organischer Verbindungen, die - trotz ihrer enormen Strukturvielfalt und z. T. hohen Produktionsziffern - durch Mikroorganismen in der Regel vollständig mineralisiert werden können. Gewisse Xenobiotika belasten jedoch in zunehmendem Maße Böden und Gewässer. Solche Verbindungen bezeichnet man als persistent, weil sie offenbar unter allen biotischen Bedingungen verlangsamt abgebaut werden. Fehlen darüberhinaus abiotische Senken, so kommt es zur weltweiten Akkumulation dieser Stoffe. Neben physikalischen Faktoren, wie hohe Polarität, großes Molekulargewicht oder geringe Wasserlöslichkeit (WODZINSKI und JOHNSON, 1968; WODZINSKI und COYLE, 1974) müssen auch chemische Parameter für die „unerwünschte Persistenz" (KORTE und KLEIN, 1971) verantwortlich sein. Das Schicksal gewisser Xenobiotika in Böden, Flüssen und Meeren ist nahezu unerforscht, da für die polaren Umweltchemikalien oft keine empfindlichen analytischen Methoden der Trennung und Detektion zur Verfügung stehen. Ihre Akkumulation wird oft erst durch das Auftreten akuter oder chronischer Toxizität für die Tier- und Pflanzenwelt erkannt.

In den letzten Jahren hat die Gruppe der sulfonierten aromatischen Kohlenwasserstoffe besondere Aufmerksamkeit hervorgerufen. Eine Reihe dieser Verbindungen besitzt große technische Bedeutung. Höhere Alkylbenzolsulfonate mit einem Alkylrest von 12 bis 15 Kohlenstoffatomen werden z. B. als Detergentien verwendet. Niedere Alkylnaphthalinsulfonate, vor allem die Butylverbindungen, stellen viel gebrauchte Netz-, Emulgier- und Flotationsmittel dar. Da sich die Sulfonsäuregruppe durch Schmelzen mit NaOH gegen die Hydroxylgruppe austauschen läßt, gewinnt man z. B. Phenol, Resorcin, Naphthol oder Alizarin über die entsprechenden Sulfonsäuren. Sulfanilsäure und eine große Anzahl sulfonierter Naphthole und Naphthylamine sind wichtige Zwischenprodukte für Azofarbstoffe, denen die hydrophile Sulfonsäuregruppe Wasserlöslichkeit verleiht. Die-

se Eigenschaft wird industriell in großem Maßstab genutzt, zumal die SO_3H-Gruppe chemisch leicht in aromatische Verbindungen eingeführt werden kann.

Steigende Produktionsziffern, ein breites Anwendungsspektrum sowie hohe Verteilungstendenzen der aromatischen Sulfonsäuren stellen ein nicht überschaubares Umweltproblem dar. Ihr Schicksal ist noch weitgehend unerforscht, weil keine befriedigenden analytischen Techniken für die Trennung und empfindliche Detektion dieser hochpolaren Verbindungen zur Verfügung stehen. EBERLE et al. (1974) beschrieben eine neue Analysenmethode für Wasserverunreinigungen. Mittels Differential-Pulspolarographie bestimmten sie die Konzentration an Ligninsulfonsäuren im Rhein und einigen seiner Nebenflüsse. Sie beträgt bis zu 25 % des gelösten organischen Kohlenstoffes („total organic carbon"; TOC) des Wassers. Bei den Untersuchungen wurde in den Polarogrammen ein weiteres, bislang nicht identifiziertes, intensives Signal gefunden, welches auf niedermolekulare Schwefelverbindungen zurückzuführen ist (EBERLE, persönliche Mitteilung). Aufgrund der unzulänglichen Detektion von hochpolaren Verbindungen kann bis jetzt nur vermutet werden, daß neben unvollständig abgebauten Benzolsulfonsäuren mit linearen Seitenketten („linear alkylbenzene sulfonates"; LAS) aus Detergentien hauptsächlich sulfonierte Naphthaline aus der Farbstoffherstellung die Ligninsulfonsäuren begleiten.

Als in den 50er Jahren Schaumkronen auf Flüssen und in Kläranlagen von der Persistenz aromatischer Sulfonsäuren zeugten, wurden umfangreiche mikrobiologische Untersuchungen zum Abbau von Alkylbenzolsulfonaten durchgeführt (s. Übersicht SWISHER, 1970; GLEDHILL, 1974). Obwohl aromatische Sulfonsäuren bislang nicht in der Natur gefunden wurden, gibt es Bakterien, welche die einfachen Vertreter dieser Verbindungsklasse, die Alkylbenzolmonosulfonate, als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten können.

Dem Totalabbau aromatischer Verbindungen geht die Aktivierung des aromatischen Kernes durch Einführung zweier ortho- oder para-ständiger OH-Gruppen voraus. Substituenten wie SO_3H würden die Diphenole stark desaktivieren und den elektrophilen Angriff der Dioxygenasen erschweren. In allen bislang bekannten Abbauwegen alkylierter Benzolsulfonate erfolgt erwartungsgemäß die Abspaltung der SO_3H-Gruppe vor der Ringöffnungsreaktion; es wird zunächst entweder Sulfit (CAIN und FARR, 1968; WILLETTS und CAIN, 1972; HORVATH und KOFT, 1972) oder Sulfat (FOCHT und WILLIAMS, 1970; RIPIN et al., 1971; WILLETTS, 1973) eliminiert.

Unter den standardisierten Bedingungen der Ermittlung des biochemischen Sauerstoffbedarfs (BSB_5; Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, 1966) erweisen sich sulfonierte Naphthaline als weitgehend persistent (Fa. Bayer, Leverkusen; persönliche Mitteilung). Die Frage nach den Ursachen des verlangsamten biologischen Abbaus der Naphthalinsulfonsäuren kann nur dann beantwortet werden, wenn es gelingt, vergleichende Umsatzkinetiken mono- und polysulfonierter Naphthaline an geeigneten Bakterien zu messen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit sollte es sein, erstmals Bakterien zu isolieren, welche die monosulfonierten Grundkörper als einzige Kohlenstoff- und Energiequellen verwerten. Angestrebt wurden Bakterien, welche neben dem verwertbaren Substrat auch Cometabolismus für isomere mono- und höher sulfonierte Naphthaline zeigen, d. h. Organismen mit verminderter Substratspezifität.

2. METHODEN

2.1. Organismen

Die Untersuchungen wurden mit neu isolierten Bakterienstämmen durchgeführt, die Naphthalin und Naphthalin-2-sulfonsäure als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten. Zu taxonomischen Bestimmungen wurden die isolierten Stämme mit Pseudomonas putida DSM 291, Bacillus cereus DSM 299 und Pseudomonas testosteroni DSM 38 aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen (DSM), Göttingen, verglichen.

2.2. Nährlösung

Die Nährlösung für Anreicherungs- und Wachstumsversuche hatte folgende Zusammensetzung:

$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	12	g
KH_2PO_4	2	g
NH_4NO_3	500	mg
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	100	mg
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4\ H_2O$	50	mg
$FeCl_2 \cdot 4\ H_2O$	7,5	mg
Spurenelementlösung	0,1	ml
Kohlenstoffquelle	1	g
H_2O	ad 1000	ml

Für feste Nährböden wurde 2 % Bactoagar zugesetzt. Bei schwefelfreien Substraten wurde NH_4NO_3 gegen $(NH_4)_2SO_4$ als Schwefelquelle ausgetauscht. Naphthalin wurde als Substrat über die Dampfphase verfüttert. Bei festen Nährböden wurde Naphthalin in die Deckel der Petrischalen gegeben. Bei Anzucht im Erlenmeyerkolben wurde das feste Substrat zwischen zwei Schaumstoffkappen gebracht. Bei kontinuierlichen Kulturen oder Fermenteransätzen wurde die Zuluft durch eine Säule geleitet, die ein Gemisch aus Glasperlen und feingemahlenem Naphthalin ent-

hielt.

Für Anzuchten, bei denen Sulfat-Bildung gemessen werden sollte, wurde folgende sulfatfreie Spurenelementlösung zugesetzt:

$ZnCl_2$	50 mg
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$	30 mg
H_3BO_3	300 mg
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200 mg
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$	10 mg
$NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$	20 mg
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	30 mg
H_2O	ad 1000 ml

Die im voranstehenden Mineralmedium verwendete Spurenelementlösung nach PFENNIG und LIPPERT (1966) wurde durch 0,1 ml dieser Lösung ersetzt.

2.3. Anreicherung und Isolierung Naphthalin-2-sulfonsäure-abbauender Mikroorganismen

Als Ausgangsmaterial für die Anreicherung von Naphthalin-2-sulfonsäure-verwertenden Bakterien dienten Flüssigkeitsproben aus dem Fermentationsbecken der Göttinger Kläranlage. Zu je 500 ml Abwasserprobe wurden Mineralsalze (vgl. 2.2.), 2 g Natrium-Succinat, 100 mg Hefeextrakt und 500 mg Naphthalin-2-sulfonsäure gegeben. Die Ansätze wurden in 2 l-Erlenmeyerkolben mit Schikanen 24 Std. bei 30° auf dem Rundschüttler inkubiert. Danach wurden grobe Partikel mit einem Faltenfilter abgetrennt. Mit dem durch Zentrifugation (8 000 x g; 30°; Zeta 20, Fa. Heraeus-Christ, Osterode/Harz) gewonnenen Pellet wurde frisches Mineralmedium beimpft. Die Anzucht erfolgte in einer kontinuierlichen Kultur (Abb. 1) bei 30°.

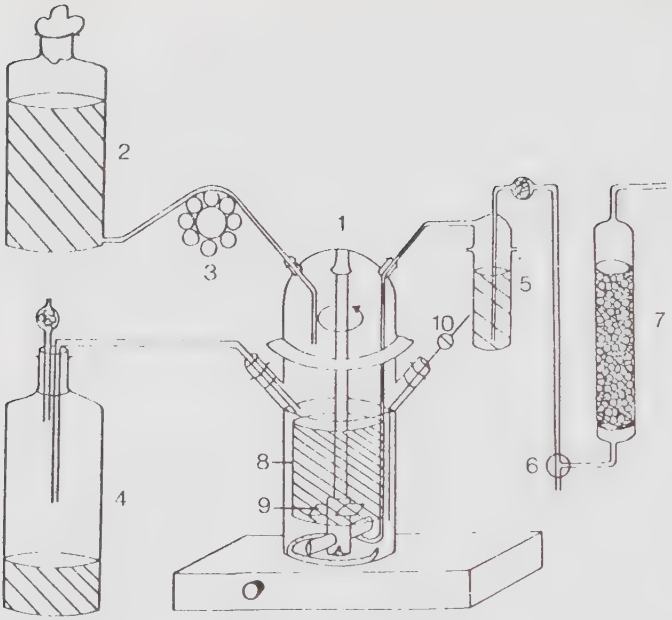


Abb. 1 Schematische Darstellung des Chemostaten

Erläuterungen s. Text.

Der Chemostat bestand aus einem Kulturgefäß (1) mit 500 ml Arbeitsvolumen, in das aus einem Vorratsbehälter (2) Nährlösung (Mineralmedium mit 1 g/ l Naphthalin-2-sulfonsäure) über eine

Pumpe (3) mit konstanter Zuflußrate einfloß (70 ml/24 Std.). In dem Maße, wie Nährlösung zugeführt wurde, trat Bakteriensuspension aus, die im Überlaufgefäß (4) aufgefangen wurde. Die Zuluft wurde in einer Waschflasche (5) befeuchtet. Nach Bedarf konnte durch einen Dreiwegehahn (6) eine mit Naphthalin gefüllte Säule (7) zugeschaltet werden. Für optimale Sauerstoffzufuhr sowie eine gleichmäßige Verteilung der zufließenden Nährstoffe wurde das Kulturgefäß nach dem Waldhofsystem ausgelegt. Ein mit der Zuluftleitung verschraubter Stahlzylinder (8) und ein Propellerflügelpaar (9) aus Teflon wurden zusätzlich in das mit geführter Magnetrührung ausgestattete käufliche Gefäß (Fa. Bellco, Vineland, USA) eingebaut. Proben konnten durch eine Kanüle mit Absperrhahn (10) entnommen werden.

In Abständen von einer Woche wurde die Mischpopulation auf Agarplatten ausgestrichen, die als einzige Kohlenstoff-, Schwefel- und Energiequelle Naphthalin-2-sulfonsäure enthielten.

In einem zweiten Experiment wurde eine Abwasserprobe, wie oben beschrieben, aufgearbeitet und zunächst zur Anreicherung von Naphthalin-Verwertern in kontinuierlicher Kultur verwendet. Das Reaktionsgefäß wurde mit 70 ml/24 Std. Mineralmedium ohne Kohlenstoffquelle durchströmt. Naphthalin wurde über die Gasphase zugefüttert (vgl. Abb. 1). Der Naphthalin-verwertenden Mischpopulation wurden später steigene Mengen Naphthalin-2-sulfonsäure als zusätzliche Kohlenstoffquelle angeboten. Die Sulfonsäure-Konzentration im Vorratsbehälter wurde allmählich bis auf 2 g/l Nährlösung erhöht, während die Zufuhr von Naphthalin unterbrochen wurde.

2.4. Aufbewahrung und Reinheitskontrolle

Die Stammkulturen wurden in Schrägröhrchen bei 4^{o} im Kühlschrank aufbewahrt und einmal im Monat überimpft.

Die Reinheit der Kulturen wurde durch Ausstreichen auf Naphthalin-2-sulfonsäure sowie auf Komplexmedium (Nutrient Broth 0,8 %; NaCl 0,5 %; Agar 2 %) und durch mikroskopische Kontrolle überprüft.

2.5. Anzucht von Zellmaterial

Kleinere Kulturen (200 und 500 ml) wurden in 1 bzw. 2 l-Erlenmeyer-Kolben mit Schikanen bei 30° auf einem Rundschüttler (Typ RC 106, Fa. Finfors AG, Basel) bei 150 upm inkubiert. Die Anzucht größerer Zellmengen erfolgte je nach Bedarf in 4- oder 10 l-Fermentern (Biostat, Fa. Braun, Melsungen). Die 3 bzw. 8 l Medium enthaltenden Kulturgefäße wurden bei 30° inkubiert, mit 5 bzw. 8 l Luft pro Minute begast und mit 600 upm gerührt. Es wurde jeweils mit 10 % Vorkultur beimpft; Kohlenstoff- und Energiequelle war Naphthalin-2-sulfonsäure. Die Zellen wurden in der späten exponentiellen Wachstumsphase abzentrifugiert (8 000 x g; Zeta 20, Fa. Heraeus-Christ, Osterode/Harz), wenn nicht anders erwähnt, zweimal mit 80 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) gewaschen und in dem gleichen Puffer resuspendiert.

2.5.1. Isolierung von Metaboliten

Die Zellen zweier 8 l Kulturen von Pseudomonas sp. A 1 wurden in 6 l Phosphatpuffer, der 12 g Naphthalin-2-sulfonsäure (NS-2) enthielt, resuspendiert und im 10 l-Fermenter, wie oben beschrieben, inkubiert. Die Substratabnahme bzw. die Metabolitzunahme wurde mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC; vgl. 2.12.1.) verfolgt. Nachdem die Bildung von Zwischenprodukten zum Stillstand gekommen war, wurden die Zellen abzentrifugiert und verworfen. Das Überstehende wurde, wie unter 3.3.2. beschrieben, aufgearbeitet.

Zur Cooxidation von Naphthalin-2-carbonsäure durch Pseudomonas testosteroni A 3 wurde eine 7 l Kultur auf Naphtha-

lin-2-sulfonsäure (0,1 %) im Fermenter angezogen. Zur Erhöhung der Zellkonzentration wurde gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase mit Hilfe einer Schlauchpumpe (Varioperpex, Fa. LKB, Bromma, Schweden) eine 40fach konzentrierte Lösung des Substrats + Mineralsalze so zugeführt, daß NS-2 der Kultur ständig als Kohlenstoffquelle zur Verfügung stand. Die Verwertung wurde mit Hilfe der HPLC verfolgt. Zusätzlich wurde der pH-Wert in zeitlichen Abständen bestimmt. Nachdem dieser auf pH 6,7 abgefallen war, erfolgte durch Zugabe von 1 N NaOH (100 ml) eine Korrektur auf pH 7,3. Bei einer optischen Dichte von ca. 3,0 wurde die Substratzufuhr eingestellt und statt dessen Naphthalin-2-carbonsäure (700 mg) in die Kultur gegeben. Die Bildung des Oxidationsprodukts konnte mit der HPLC verfolgt werden und war nach 3 Std. beendet. Die Zellen wurden abzentrifugiert und das Überstehende, wie unter 2.14.1. beschrieben, weiter aufgearbeitet.

2.5.2. Untersuchungen zum Umsatz von Naphthalinsulfonsäuren durch eine Mischpopulation in statischer Kultur

Zur Anzucht größerer Zellmengen diente ein Chemostat (Aufbau vgl. 2.3.) mit großem Kulturgefäß (2 l Arbeitsvolumen). Das Mineralmedium mit 1 g/l Naphthalin-1-sulfonsäure (Fa. Fluka; lt. HPLC 30 % 2-Isomeres enthaltend) wurde mit 200 ml der auf Naphthalin vorangereicherten Kultur (vgl. 2.3.) angeimpft. Der Zulauf an Nährlösung (unter 2.2. aufgeführte Mineralsalze + 2 g/l des NS-2/NS-1-Gemisches) betrug 300 ml in 24 Std. Die Kultur hatte nach 3 Tagen eine konstante Trübung (OD_{546} = 1,8) erreicht. Aus einer Probe wurden die Zellen durch Zentrifugation abgetrennt und in frischem Mineralmedium (50 ml) resuspendiert (OD_{546} = 8,4). In statischer Kultur wurde das NS-2/NS-1-Gemisch oder Naphthalindisulfonsäuren (jeweils 1 mM) hinzugegeben und bei 30° auf dem Rundschüttler inkubiert. Die 500 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikanen waren mit Gummikappen verschlossen, um Flüssigkeitsverluste zu vermeiden. Proben

wurden durch Kanülen mit Absperrhahn entnommen. Die Abnahme der Substrate wurde mit der HPLC verfolgt.

2.6. Taxonomische Bestimmungen

Untersuchungen der kulturellen, morphologischen und biochemischen Merkmale der isolierten Bakterienstämme wurden nach den bei STANIER et al. (1966) aufgelisteten Methoden durchgeführt.

2.7. Messung des Bakterienwachstums

Die optische Dichte (Trübung) von Zellsuspensionen wurde in 1 cm-Quarzküvetten mit dem Photometer PM 6 (Fa. Zeiss, Oberkochen) bei einer Wellenlänge von 546 nm im Extinktionsbereich 0 - 0,3 bestimmt.

2.8. Bereitung zellfreier Extrakte

Zur Herstellung zellfreier Extrakte wurden gewaschene Zellen in 33 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) aufgenommen (3 g feuchte Zellmasse/10 ml Puffer). Nachdem der Zellsuspension eine Spatelspitze DNase zugesetzt worden war, wurde sie bei 8 t/cm^2 mit einer vorgekühlten French-Presse aufgeschlossen und in einer gekühlten Vorlage aufgefangen. Ganze Zellen, Zelltrümmer und die Membranfraktion wurden durch Zentrifugation (120 000 x g; 60 Min.; Omikron, Fa. Heraeus-Christ, Osterode/Harz) abgetrennt. Das Überstehende wurde direkt zu enzymatischen Tests herangezogen.

2.9. Proteinbestimmungen

Die Proteinbestimmung von ganzen Zellen wurde nach der von SCHMIDT et al. (1963) modifizierten Methode von LA RIVIERE (1958) durchgeführt. Für zellfreie Extrakte wurde die Biuret-Methode nach BEISENHERZ et al. (1953) oder die Methode nach LOWRY et al. (1951) herangezogen. In beiden Fällen diente eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin als Standard.

2.10. Bestimmung von Enzymaktivitäten

2.10.1. Photometrische Messungen

Photometrische Bestimmungen von Enzymaktivitäten wurden bei einer Schichtdicke von d = 1 cm mit einem Zeiss PM 6 Spektralphotometer durchgeführt und von einem Kompensationsschreiber (Servogor RE 541, Fa. Goertz, Wien) aufgezeichnet. Die Messungen erfolgten jeweils bei Raumtemperatur.

Eine Einheit entsprach derjenigen Aktivität, welche die Umwandlung von 1 µmol Substrat pro Min. unter den angegebenen Bedingungen katalysierte. Bei Angabe der spezifischen Aktivität wurde die Enzymeinheit auf ein mg Protein bezogen.

Salicylsäurehydroxylase (EC 1.14.1.a.) (YAMAMOTO et al., 1965)

Das Reaktionsgemisch enthielt:

2,84 ml	33 mM	Tris-HCl-Puffer	(pH 8,0; 93 µmole)
0,1 ml		Extrakt	
0,02 ml	5 mM	NADH	(100 nmole)
0,02 ml	10 mM	Na-Salicylat	(200 nmole)
0,02 ml	1 mM	FAD	(20 nmole)

Es wurde die Extinktionsänderung ΔE/Min. bei 340 nm gemessen.

Gentisinsäureoxygenase (WHEELIS et al., 1967)

Das Reaktionsgemisch enthielt:

2,86 ml	33 mM	Tris-HCl-Puffer	(pH 8,0; 94 µmole)
0,1 ml		Extrakt	
0,02 ml	10 mM	$FeSO_4$	(200 nmole)
0,02 ml	10 mM	Gentisinsäure	(200 nmole)

Es wurde die Zunahme des Ringspaltungsproduktes durch Messung der Extinktion bei 340 nm bestimmt. Den Berechnungen lag ein

Absorptionskoeffizient von ε = 3400 für Maleylpyruvat zugrunde.

Metapyrokatechase (EC 1.13.11.2.) (BIRD und CAIN, 1974)

Das Reaktionsgemisch enthielt:

2,93 ml	33 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 97 µmole)	
0,05 ml	Extrakt	
0,02 ml	10 mM Brenzkatechin	(200 nmole)

Die Zunahme des Ringspaltungsproduktes wurde durch Extinktionsmessung bei 375 nm verfolgt. Der Berechnung der spezifischen Aktivität lag ein Absorptionskoeffizient von ε = 33500 für α-Hydroxymuconsäuresemialdehyd zugrunde.

Pyrokatechase (EC 1.13.11.1.) (SISTROM und STANIER, 1954)

Das Reaktionsgemisch enthielt:

2,86 ml	33 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; 94 µmole)	
0,1 ml	40 mM EDTA	(4 µmole)
0,02 ml	Extrakt	
0,02 ml	10 mM Brenzkatechin	(200 nmole)

Bestimmt wurde die Zunahme des Ringspaltungsproduktes (cis,cis-Muconsäure) durch Extinktionsmessung bei 260 nm.

2.10.2. Manometrische Bestimmungen

Sauerstoffaufnahmeraten von Bakteriensuspensionen wurden mit einer Rund-Warburg-Apparatur (Fa. Braun, Melsungen) unter Verwendung einarmiger Standardgefäße durchgeführt. Die Schüttelfrequenz betrug 120/Min. bei einer Amplitude von 6 cm; die Inkubationstemperatur war jeweils 30°. Zellen der logarithmischen Wachstumsphase wurden zweimal mit 80 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) gewaschen und im gleichen Puffer resuspendiert. Die zur Messung

der Gasaufnahme geeignete Zelldichte wurde unter Berücksichtigung des Proportionalitätsbereiches durch Vorversuche ermittelt. Die angegebenen Werte wurden jeweils um die der endogenen Atmung korrigiert. Im Zentralzylinder der Warburggefäße befand sich bei allen Versuchen 0,2 ml wäßrige KOH (20 %ig) zur CO_2-Absorption.

Der Einfluß des Lösungsvermittlers Dimethylsulfoxid (DMSO) auf den Abbau von Naphthalin wurde im Kontrollversuch getestet. Die Reaktionsgefäße enthielten im Hauptraum jeweils 1 ml Zellsuspension und 1,178; 1,09; 0,98; 0,87 bzw. 0,76 ml Phosphatpuffer, im Seitenarm waren jeweils 2 µmole Naphthalin in 0,022; 0,11; 0,22; 0,33 bzw. 0,44 ml DMSO gelöst. Der Anteil an DMSO in den Reaktionsansätzen entsprach jeweils 1 %; 5 %; 10 % bzw. 15 %.

Die Substrate wurden als Lösungen in DMSO zugegeben. Die Warburggefäße enthielten im Hauptraum jeweils 2,18 ml Zellsuspension und im Seitenarm 2 µmole Substrat in 0,02 ml DMSO gelöst.

Für Induktionsversuche wurden die auf Succinat (5 mM) angezogenen Zellen von Pseudomonas testosteroni Stamm A 3 über Nacht mit jeweils 2 mM Naphthalin, 2-Hydroxynaphthalin, Naphthalin-2-sulfonsäure, Naphthalin-1-sulfonsäure, Salicylsäure, Naphthalin-2-carbonsäure und Gentisinsäure inkubiert. Nach Abtrennen der Zellen wurden diese zweimal in 80 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) gewaschen und im gleichen Puffer derart resuspendiert, daß jeweils eine OD_{546} = 0,6 erhalten wurde. Die Sauerstoffaufnahmeraten verschieden induzierter Zellen wurden anhand der Oxidation von Naphthalin-2-sulfonsäure bestimmt. Die Warburggefäße enthielten im Hauptraum jeweils 2 ml Zellsuspension, im Seitenarm 2 µmole Naphthalin-2-sulfonsäure, gelöst in 0,2 ml Puffer.

Zur Messung der Metapyrokatechase-Aktivität wurde die lösliche Fraktion von frisch bereiteten zellfreien Extrakten von Pseudomonas sp. A 1 zur Inaktivierung der Folgeenzyme für 10 Min. auf 55° erwärmt (TRECCANI et al., 1968). Nach dem Abtrennen von koaguliertem Protein, wurde 10 % (v/v) Aceton zum Überstehenden gegeben (NOZAKI et al., 1963). Für die Messung der Sauerstoffaufnahmerate durch diesen Rohextrakt beim Umsatz von Brenzkatechin enthielten die Warburggefäße im Hauptraum 1 ml zellfreien Extrakt und 1 ml 33 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0), im Seitenraum 4 µmole Brenzkatechin in 0,2 ml Puffer gelöst. Nach beendeter Reaktion wurde das gebildete Produkt zusätzlich photometrisch bestimmt. Den Berechnungen lag ein Extinktionskoeffizient von ε = 33500 für α-Hydroxymuconsäuresemialdehyd bei 375 nm (BIRD und CAIN, 1974) zugrunde.

2.10.3. Hemmkinetische Messungen mit der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie

Zur Analyse der Substratspezifizität der den Abbau von Naphthalin-2-sulfonsäure einleitenden Enzyme wurde der Einfluß von Substratanalogen auf den Umsatz von Sulfonsäure ermittelt. Es wurden nicht gewaschene Zellen von Pseudomonas testosteroni A 3 nach Anzucht auf Naphthalin-2-sulfonsäure jeweils in 49 ml Phosphatpuffer (80 mM; pH 7,4) in 500 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikanen resuspendiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrats bzw. Hemmstoffs (50 µmole in 0,5 ml DMSO) gestartet. Die Ansätze wurden bei 30° auf dem Rundschüttler inkubiert. Im Abstand von 15, 30 oder 60 Min. wurden Proben entnommen (1 ml). Die Zellen wurden mit einer Mikro-Hämatokritt-Tischzentrifuge (Fa. Heraeus-Christ, Osterode/Harz) abgetrennt und das Überstehende (5 µl) mit Hilfe der HPLC (vgl. 2.12.1.) analysiert.

Der Einfluß von 2-Hydroxynaphthalin auf den Umsatz der Naphthalin-2-sulfonsäure wurde in Gegenwart des Substrats und des

Hemmstoffs gemessen. In einem Parallelansatz wurde die Verwertung der Sulfonsäure allein verfolgt. Die Trübung betrug OD_{546} = 0,66.

Der Umsatz der Naphthalin-2-sulfonsäure in Gegenwart von Naphthalin wurde entsprechend verfolgt, jedoch wurden die Kolben mit Gummikappen verschlossen, um ein Entweichung des flüchtigen Aromaten zu vermeiden. Die Probenentnahme erfolgte durch eine Kanüle mit Absperrhahn. Der Umsatz der Sulfonsäure ohne Hemmstoff wurde in einem Parallelansatz verfolgt. Die Zellsuspension hatte eine Trübung von OD_{546} = 0,66.

Weiterhin wurde der Einfluß der Naphthalin-2-carbonsäure auf den Umsatz von Naphthalin-2-sulfonsäure untersucht. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 µmole Naphthalin-2-carbonsäure und 100 µmole NS-2 (jeweils in 0,5 ml DMSO) gestartet. Der Parallelansatz enthielt nur die Carbonsäure. Die Zellsuspension hatte eine Trübung von OD_{546} = 2,7.

2.11. Bestimmung von Sulfat und Sulfit in der Nährlösung

Sulfat wurde mit Bariumchloranilat nach BERTOLACINI und BARNEY, 1957, (modifiziert) bestimmt. Die zu untersuchende zellfreie Kulturflüssigkeit ($\leq$ 30 ml) wurde mit 50 ml Äthanol versetzt und mit H_2O auf ca. 80 ml aufgefüllt. Nach Einstellen des pH auf 4,0 mit 1 M Citronensäure wurde in einen 100 ml-Meßkolben überführt und 300 mg Bariumchloranilat zugegeben. Es wurde mit H_2O auf 100 ml aufgefüllt und anschließend 10 Min. geschüttelt. Nach dem Abtrennen von ungelösten Partikeln wurde die Extinktion des Testansatzes bei 530 nm photometrisch gegen eine sulfatfreie Probe bestimmt (d = 2 cm). Die Eichkurve wurde mit wäßriger K_2SO_4-Lösung aufgenommen und war im Bereich von 0 - 40 µmole Sulfat pro Testansatz linear (Abb. 2a, s. S. 16).

Sulfit wurde in zellfreien Kulturflüssigkeiten mit Fuchsin-Formaldehyd (PACHMAYR, 1960) colorimetrisch bestimmt. Die Probe ($\leq$ 60 ml) wurde in einem 100 ml-Meßkolben, der 20 ml einer 2 %-igen $Zn(Ac)_2$-Lösung enthielt, mit Wasser bis ca. 80 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 10 ml Fuchsinlösung (400 mg Fuchsin in 1 l 12,5 %ige H_2SO_4) wurde geschüttelt und nach 10 Min. 1 ml Formaldehyd (35 %ig in Wasser) zugegeben. Nach dem Auffüllen auf 100 ml mit Wasser wurde genau 10 Min. nach Aldehydzugabe die Extinktion des Testansatzes bei 578 nm ermittelt. Als Leerwert diente eine sulfitfreie Probe, die dem gleichen Arbeitsgang unterworfen worden war. Die Messung erfolgte in 1 cm-Küvetten. Die Eichkurve wurde mit einer frisch bereiteten wäßrigen Na_2SO_3-Lösung aufgenommen und war im Bereich von 0 - 2 µmole Sulfit pro Testansatz linear (Abb. 2b).

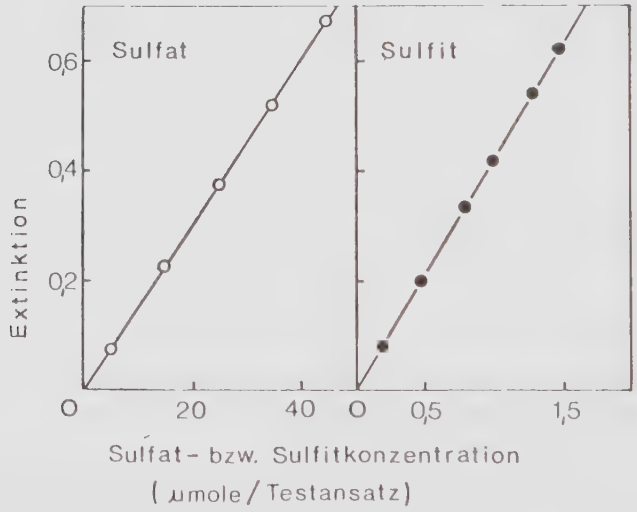


Abb. 2 Eichkurven zur Bestimmung von Sulfat und Sulfit in der Kulturflüssigkeit

Sulfat wurde mit der Bariumchloranilat-Methode, Sulfit mit Fuchsin-Formaldehyd bestimmt. Als Standard dienten wäßrige K_2SO_4- bzw. Na_2SO_3-Lösungen (Erläuterungen s. Text).

2.12. Chromatographische Methoden

2.12.1. Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur Auftrennung von Substanzgemischen wurden die zu untersuchenden Proben (5 µl) an einer Umkehrphase (Octadecylsilan chemisch gebunden an LiChrosorb, SIL-X Micro Pak C-H, Ø 2 mm, 25 cm lang, Fa. Varian) mit verdünnter Phosphorsäure als mobile Phase chromatographiert. Die verwendeten Fließmittelgemische hatten folgende Zusammensetzung: 0,01 M H_3PO_4 + 1 % Propanol-2 (A) und 50 % A + 50 % Methanol (B). Die Trennungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Der Aufbau des verwendeten Hochdruck-Flüssigkeitschromatographen mit Zusatzgeräten ist schematisch in Abb. 3 wiedergegeben.

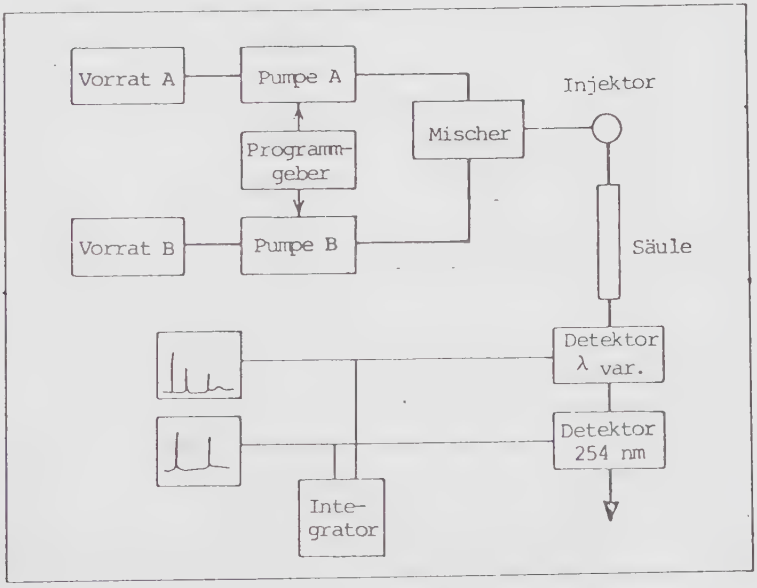


Abb. 3 Schematischer Aufbau des verwendeten Hochdruck-Flüssigkeitschromatographen

Erläuterungen zu den einzelnen Bausteinen s. Text.

Zwei zwangsfördernde Langhub-Kolbenpumpen A und B werden unabhängig voneinander durch einen Programmgeber gesteuert, so daß beliebige Mischungsverhältnisse zweier Flüssigkeitssysteme (Zusammensetzung s. o.) sowie die Fließgeschwindigkeit programmiert sind. Das Aufsetzen der Analysen (Hamiltonspritze) erfolgt nach Unterbrechen des Flusses drucklos mit Hilfe eines septumlosen Hochdruckinjektors. Die Detektion der aufgetrennten Substanzen erfolgt mit Hilfe eines Durchfluß-UV-Photometers mit Mikrozellen (8 µl) bei konstanter Wellenlänge (254 nm). Zusätzlich wird ein zweiter, ebenfalls mit Mikrodurchflußzelle ausgestatteter Detektor, in dem die Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes variiert werden kann (Spektralphotometer Variscan TM, Modell 635, 1. Serie, Fa. Varian Techtron, Springvale, Australien) nachgeschaltet. Mit letzterem Gerät sind Substanzen erfaßbar, die bei kürzeren Wellenlängen ($\geq$ 200 nm) absorbieren. Der Spektralphotometer-Detektor ermöglicht bei Unterbrechung des Flusses die Aufnahme eines UV-Spektrums in situ. Die quantitative Auswertung der mit einem Zweikanal-Schreiber (Modell A 25, Fa. Varian, Walnut Creek, USA) aufgezeichneten Peaks erfolgt durch einen Integrator (Autolab System I, Fa. Spectra Physics, Santa Clara, USA).

2.12.2. Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur Kontrolle von Derivatisierungsreaktionen sowie zur Identifizierung von aus der Kulturflüssigkeit extrahierbarer Metabolite wurden die Substanzgemische an Kieselgelschichten (Fertigplatten F_{254}, Schichtdicke 0,1 mm, Fa. Merck, Darmstadt) aufgetrennt. Dazu wurden die Reaktionsansätze oder eingeengten organischen Phasen direkt mit Hilfe ausgezogener Schmelzpunktkapillaren bandenförmig aufgetragen. Der Gehalt an zu trennenden Substanzen wurde so gewählt, daß sich die Startzone durch intensive Fluoreszenzlöschung zu erkennen gab. Zur Anfärbung von Substanzen dienten zusätzlich Folin-Ciocalteu-Reagens für aromatische Hydroxylverbindungen und 2,4-Dinitrophenylhydra-

zin-Lösung (100 mg/100 ml 2N HCl) für Carbonylverbindungen. Es wurde stets nach der aufsteigenden Methode chromatographiert. Die Laufhöhe der Lösungsmittelfront bei der Bestimmung der Rf-Werte betrug jeweils 15 cm. Fließmittelsysteme sowie Rf-Werte sind in Tab. 16 im Anhang zusammengestellt.

2.12.3. Präparative Dünnschichtchromatographie

Zur Reindarstellung von Substanzen wurden die gelösten Rohprodukte bzw. der Reaktionsansatz direkt an präparativen Kieselgel-Schichten chromatographiert. Die Herstellung dieser Schichten erfolgte mit Hilfe eines Beschichtungsgeräts (TLC-Applicator, Fa. Camag, Muttenz, Schweiz). Es wurden 190 g Kieselgel (Korngröße 60 mesh mit Fluoreszenzindikator PF 254, Fa. Merck, Darmstadt) mit 420 ml Wasser durch Schütteln homogenisiert. Die Suspension wurde auf 20 x 20 cm Glasplatten aufgebracht (Schichtdicke 1 mm). Nach dem Trocknen an einem zugfreien Platz bei Raumtemperatur wurden die Schichten durch fünfstündiges Erhitzen auf 130° aktiviert.

Die eingeengten Lösungen der zu chromatographierenden Substanzgemische wurden mit ausgezogenen Pasteur-Pipetten bandenförmig aufgetragen. Gleichmäßiges Aufbringen der Lösungen auf das Trägermaterial wurde bei größeren Ansätzen mit dem Autoliner 75 der Fa. Desaga, Heidelberg, erreicht. Die Entwicklung der Platten erfolgte, wie bei der qualitativen DC, in den in Tab. 16 aufgeführten Fließmittelsystemen.

2.13. Spektroskopische Methoden

Die Aufnahme der UV-Spektren erfolgte mit dem Zeiss-Spektralphotometer DMR 21 bzw. DMR 10. Zur Messung bei konstanter Wellenlänge wurde ein Zeiss-Photometer PM 6 herangezogen. Alle Messungen wurden in 1 cm-Quarzküvetten durchgeführt.

Die IR-Spektren wurden mit dem IR-Spektralphotometer SP 1000 der Fa. Pye Unicam aufgezeichnet. Dabei wurden die zu untersuchenden Substanzen entweder in ein KBr-Preßling, mit Nujol verrieben zwischen NaCl oder in CCl_4 gelöst zwischen CaF-Fenster gebracht.

Die NMR-Spektren wurden mit einem HA 100-MHz-NMR-Gerät der Fa.Varian aufgenommen. Die δ-Werte entsprechen dem Mittelpunkt der Integrationslinien. Als innerer Standard diente Tetramethylsilan (TMS). Die Probe wurde zur Aufnahme der Spektren in Deuterochloroform ($CDCl_3$) gelöst.

Die massenspektroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Dupont-Gerät, No. 21-492, bei einer Beschleunigungsspannung von 1800 Volt durchgeführt. Die Substanz wurde im Glasröhrchen mit reinem Seesand abgedeckt und über den Festkörpereinlaß in die Ionenquelle eingeführt. Eine Aufheizung war wegen des hohen Dampfdrucks der Substanzen nicht erforderlich.

Die CD-Spektren wurden mit einem Cary 60 Recording Spektropolarimeter mit Circular Dichroism Accessory 6003 (Cary Instruments, Monrovia, Kalifornien) aufgezeichnet. Die Messung erfolgte in zylindrischen Quarzküvetten (d = 0,2 cm). Die molare Elliptizität wurde in grd x cm^2 x $decimol^{-1}$ angegeben.

2.14. Isolierung und Derivatisierung von Metaboliten

2.14.1. Extraktion mit organischen Lösungsmitteln

In die Kultur ausgeschiedene Metabolite oder Oxidationsprodukte wurden durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln gewonnen. Enthielt der Versuchsansatz wasserdampfflüchtige Verbindungen, so wurde in Ermangelung einer größeren Extraktionsapparatur nach Abkühlen der zellfreien Kulturflüssigkeit auf 10^{o} direkt ohne einzuengen im Fermenter mit 1/10 des Volumens Diäthyläther übergossen. Es wurde darauf geachtet, daß der Fer-

menter mit Teflondichtungen ausgerüstet war. Die beiden Phasen wurden durch Einschalten des Rührwerks gut durchmischt (10 Min.). Nachdem eine Grenzschicht zu erkennen war, wurde die untere wäßrige Phase abgelassen. Die verbleibende organische Phase wurde von Wasserresten mit Hilfe eines 2 l-Scheidetrichters abgetrennt. Nach dreimaliger neutraler Extraktion wurde mit 80 %-iger H_3PO_4 auf pH 2,3 angesäuert und nochmals wie oben behandelt. Die beiden so erhaltenen Ätherextrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet und nach Einengen mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie weiter aufgearbeitet.

Enthielt die Kultur keine wasserdampfflüchtigen Substanzen, so wurde der zellfreie Überstand am Rotationsverdampfer (Rotavapor R-10, Fa. Büchi, Flawil, Schweiz) bei 40° auf ca. 1/40 des ursprünglichen Volumens eingeengt. Nach Ansäuern auf pH 2,0 mit 80 %iger H_3PO_4 wurde die wäßrige Phase mit dem 50fachen Volumen Essigsäureäthylester extrahiert. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und, wie im experimentellen Teil beschrieben, weiter aufgearbeitet.

2.14.2. Derivatisierung der Metabolite

Methylierung mit Diazomethan

Diazomethan wurde nach DE BOER und BACKER (1954) aus N-Methyl-N-nitroso-p-toluolsulfonamid dargestellt. Die äthanolisch-ätherische Lösung war einige Tage im Kühlschrank haltbar. Zur Methylierung wurde die Äthylacetat-Lösung der zu derivatisierenden Carbonsäure bis zum Auftreten eines Konzentrationsniederschlags eingeengt. Nach tropfenweiser Zugabe von Diazomethan-Lösung wurde der Fortgang der Veresterung mit Hilfe der DC-Technik verfolgt. Nachdem die freie Säure vollständig umgesetzt war, wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und, wie im experimentellen Teil beschrieben, weiter aufgearbeitet.

Saure Veresterung mit Methanol

Die methanolische Lösung der zu derivatisierenden Carbonsäure wurde mit wenig konz. H_2SO_4 angesäuert. Nach längerem Stehen (über Nacht bei Raumtemperatur) konnte die Bildung des Methylesters mit der DC-Technik verfolgt werden. Das Reaktionsgemisch wurde durch präparative Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Die Banden der Produkte wurden mit Diäthyläther eluiert und, wie unter 3.3.2.2. beschrieben, weiter aufgearbeitet.

Acetylierung mit Acetanhydrid/BF_3

Zur Darstellung von Acetylderivaten wurden die zu charakterisierenden Verbindungen in Essigsäureanhydrid gelöst. Nach Zugabe von einem Tropfen Bortrifluorid-Ätherat wurde 2 Std. bei 90° auf dem Ölbad in einem Rundkolben mit aufgesetztem Rückflußkühler und Trockenrohr erhitzt. Nach Abtrennen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in Methanol aufgenommen und durch präparative Schichtchromatographie aufgetrennt. Die Banden der Acetylderivate wurden mit Diäthyläther eluiert und, wie unter 3.3.2.1. beschrieben, weiter aufgearbeitet.

Darstellung von 2,4-Dinitrophenylhydrazonen

Unter Schütteln wurden vorsichtig zu einer Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin (400 mg) in konz. H_2SO_4 (2 ml) tropfenweise 3 ml Wasser gegeben. Die noch warme Lösung wurde mit 10 ml Äthylalkohol (unvergällt!) versetzt. Zur Herstellung der 2,4-Dinitrophenylhydrazone wurde zu dieser jeweils frisch bereiteten Lösung die 10 bis 20 %ige äthanolische Lösung der Carbonylverbindung gegeben. Das ausgefallene Derivat wurde abgesaugt und, wie unter 3.3.2.1. beschrieben, weiter aufgearbeitet.

Derivatisierung mit 2,2-Dimethoxypropan

Zur Darstellung der Acetonide wurde die zu charakterisierende Verbindung (100 mg) in 2,2-Dimethoxypropan (5 ml) gelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,1 ml konz. HCl bei Raumtemperatur gestartet. Sie ließ sich mit Hilfe der DC verfolgen und war nach 6 Std. beendet. Das Lösungsmittel wurde abgedampft und der Rückstand, wie unter 3.4.2.3. beschrieben, weiter aufgearbeitet.

2.15. Bestimmung der Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden nach der Methode von Tottoli in einer Apparatur der Fa. Büchi, Flawil, Schweiz, ermittelt und sind nicht korrigiert.

2.16. Chemikalien

2.16.1. Bezugsquellen

Wenn nicht besonders aufgeführt, wurden handelsübliche Chemikalien der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet. Zur Anreicherung Naphthalin-1-sulfonsäure-abbauender Bakterien wurde das Na-Salz der Fa. Fluka,Buchs, Schweiz, (Reinheitsgrad: pract.) eingesetzt. Reine mono- und disulfonierte Derivate des Benzols und Naphthalins wurden von der Fa. Bayer, Leverkusen, zur Verfügung gestellt. Komplexe Nährmedien sowie Bactoagar wurden von der Fa. Difco, Detroit, USA, bezogen.

2.16.2. Reinigung des käuflichen Na-Salzes der Naphthalin-2-sulfonsäure

Das handelsübliche Na-Salz der Naphthalin-2-sulfonsäure (technisch; Fa. Riedel-de Haen, Seelze) wurde nach Waschen mit Äther getrocknet und anschließend in Wasser unter Erwärmen gelöst. Aus der filtrierten Lösung wurde das Na-Salz der Sulfonsäure mit Na-Acetat ausgefällt (FIESER und FIESER, 1968). Das

ausgesalzte Produkt wurde nach dem Trocknen gemörsert und mehrmals mit siedendem Methanol extrahiert, um Verunreinigungen durch Na-Acetat abzutrennen. Der erste Schritt (Aussalzen) wurde so oft wiederholt, bis in der Lösung kein Sulfat mehr nachweisbar war (Fällung als Ba-Salz), der zweite Schritt (Extraktion) bis das getrocknete Na-Salz der Sulfonsäure nicht mehr nach Essigsäure roch. Das so erhaltene Produkt wurde mit der HPLC (vgl. 2.12.1.) auf Reinheit überprüft. Als Vergleichssubstanz diente dabei ein von der Fa. Bayer, Leverkusen, zur Verfügung gestelltes Reinprodukt.

2.16.3. Reinigung der Fließmittel für die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie

Alle für die HPLC verwendeten organischen Lösungsmittel wurden vor Gebrauch über eine 1 m-Trennsäule der Fa. Normag, Hofheim, destilliert.

3. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

3.1. Anreicherung und Isolierung Naphthalin-2-sulfonsäure-abbauender Bakterien

Sulfonierte Naphthaline gehören aus bislang nicht geklärten Gründen zu den biologisch schwer abbaubaren Umweltchemikalien. Zur näheren Untersuchung dieser Persistenz sollten zunächst Bakterienstämme isoliert werden, welche die einfachsten Vertreter dieser Verbindungsklasse, die Naphthalinmonosulfonsäuren, als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerteten. Die Selektion solcher Mikroorganismen erfolgte kontinuierlich mit Hilfe eines unter 2.3. beschriebenen Chemostaten, welcher über längere Zeit als selbstregulierendes System betrieben werden kann. Durch allmähliche Steigerung des Selektionsdruckes, wobei bestimmte Xenobiotika als Kohlenstoff- und Energiequelle angeboten wurden, sollte eine kontinuierliche Selektion von Stämmen mit erhöhter Abbauleistung für diese Stoffe erreicht werden.

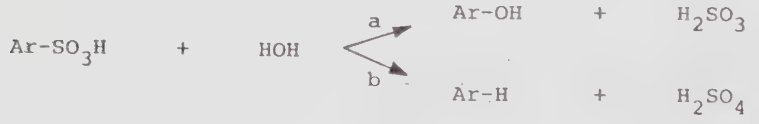
3.1.1. Direkte Isolierung mit Naphthalin-2-sulfonsäure als Substrat

Da die meisten aromatenabbauenden Bakterien Succinat als Kohlenstoffquelle verwerten können, wurde eine Abwasserprobe aus dem Belüftungsbecken der Göttinger Kläranlage zunächst mit Succinat und Hefeextrakt, um alle potentiell wertvollen Keime zu erfassen, einen Tag bei 30^{o} vorinkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und in frischem Mineralmedium (vgl. 2.2.) resuspendiert. Als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle enthielt das für den kontinuierlichen Betrieb ausgelegte Kulturgefäß (vgl. 2.3.) 1 g/l Naphthalin-2-sulfonsäure (NS-2). Nachdem die Mischpopulation eine optische Dichte (OD_{546}) von ca. 1,0 erreicht hatte (3 Tage), wurde der Zufluß an substrathaltigem (2 g/l) Mineralmedium konstant bei 70 ml/24 Std. gehalten. Nach Erreichen des Fließgleichgewichtes (2 Tage) stellte sich in der kontinuierlichen Kultur eine Trübung von etwa 1,4 (OD_{546}) ein. Es wurden Proben entnommen und auf festen Mineralböden mit

der gleichen Kohlenstoffquelle plattiert. Nach 4 - 5 Tagen Inkubation bei 30° wurden gelbe Einzelkolonien sichtbar, die auf einer Vergleichsplatte ohne Sulfonsäure nicht auftraten. Die Kolonien wurden auf frischen Substratplatten vereinzelt, bis die Kultur hinsichtlich Kolonie- und Zellform einheitlich war. Der so erhaltene Bakterienstamm erhielt zunächst die Bezeichnung Stamm A 1. Entsprechend wurde ein zweiter Stamm isoliert, der jedoch erst nach 10 - 12tägiger Inkubation kleine farblose Kolonien auf dem Naphthalin-2-sulfonsäure-Mineralnährböden bildete. Dieses als Stamm A 2 bezeichnete Bakterium wurde aufgrund des auch in Flüssigkultur schlechten Wachstums im Rahmen dieser Untersuchungen nicht weiter berücksichtigt.

3.1.2. Isolierung von Naphthalin-2-sulfonsäure-Verwertern nach Voranreicherung auf Naphthalin

Die Heterolyse der Kohlenstoff-Schwefel-Bindung in aromatischen Sulfonsäuren kann prinzipiell auf zwei Wegen erfolgen:



Der Weg a würde der chemisch unter drastischen Bedingungen durchführbaren Alkalischmelze von sulfonierten aromatischen Kohlenwasserstoffen zu den jeweiligen Phenolen und Sulfit entsprechen. Der Weg b käme der Rückreaktion der aromatischen Sulfonierung gleich, die unter unphysiologischen Bedingungen reversibel ist und den nichtsubstituierten Aromaten und Sulfat liefert.

Da die unter 3.1.1. isolierten Bakterienstämme Naphthalin nicht verwerten konnten und darüberhinaus hochspezifisch für die Verwertung von Naphthalin-2-sulfonsäure waren, sollte durch Vor-

anreicherung auf dem nicht persistenten Grundkörper nach Mikroorganismen gesucht werden, die den Alternativweg b beschritten. Die so angereicherten Bakterien sollten neben der Fähigkeit zur Verwertung von Naphthalin die zusätzliche enzymatische Eigenschaft der Heterolyse der Kohlenstoff-Schwefel-Bindung nach Weg b unter Bildung von Naphthalin und Sulfat besitzen. Wenn letztere Eigenschäft substratunspezifisch vorläge, so sollte der entsprechende Organismus sowohl Isomere als auch höher sulfonierte Naphthaline abbauen und verwerten können.

Mit den aus der Vorinkubation der Abwasserproben mit Succinat und Hefeextrakt erhaltenen Zellen (vgl. 3.1.1.) wurde ein Mineralsalzmedium beimpft, das über die Zuluft mit Naphthalin als Kohlenstoffquelle versorgt wurde. In dem als Chemostat ausgelegten Kulturgefäß entwickelte sich zunächst ein reges Bakterienwachstum, das jedoch nach ca. 1 Woche durch das Auftreten von Protozoen beeinträchtigt wurde. Durch den Einsatz des nur auf Eukaryonten wirkenden Antibiotikums Cycloheximid (PESTKA, 1971) konnten diese abgetötet werden. In Vorversuchen zeigte sich, daß das Wachstum von zwei Bakterienkulturen (Stamm A 1 und P. putida DSM 291) in Gegenwart dieses Antibiotikums nicht gehemmt wurde. Wenn die Stämme auf Nutrient Broth in Flüssigkulturen angezogen wurden, stimmte die Trübung eines cycloheximidhaltigen Ansatzes in jeder Wachstumsphase mit der einer antibiotikumfreien Referenzprobe überein. Um eine Anreicherung von Cycloheximid-verwertenden Bakterien zu verhindern, wurde das Antibiotikum bei Bedarf nur kurzzeitig in hoher Dosis (50 mg/500 ml) eingesetzt.

Bei einem Zulauf von 70 ml Mineralmedium in 24 Std. stellte sich nach 14 Tagen bei Wachstum auf Naphthalin eine optische Dichte von etwa 1,8 (OD_{546}) ein. Diese blieb über 2 Monate konstant. Über einen Zeitraum von 8 Wochen wurden allmählich steigende Mengen von Naphthalin-2-sulfonsäure (NS-2) zugefüttert (der 1 l-Vorratsbehälter enthielt zunächst keine, dann 0,5 g; 1 g; 1,5 g und zuletzt 2 g der Sulfonsäure). Die Versorgung mit Naphthalin wurde unterbrochen. Die Konzentrationsände-

rungen von NS-2 in der umgestellten Kultur wurden mit Hilfe der HPLC verfolgt. Die Trübung war konstant 1,5 (OD_{546}). Nach einer Gesamtlaufzeit dieser Anreicherung von 5 Monaten wurden Proben entnommen und auf festem Mineralagar ausgestrichen. Ein Teil der Platten enthielt als einzige Kohlenstoffquelle NS-2, ein anderer Teil wurde mit Naphthalin im Dampfraum inkubiert. Zur Kontrolle wurde eine Platte ohne Substrat beeimpft. Gegenüber der Vielzahl der beobachteten naphthalinverwertenden Kolonien war nur eine geringe Keimzahl zum Wachstum auf NS-2 befähigt. Nur ein Stamm, im folgenden als A 3 bezeichnet, nutzte beide Kohlenstoffquellen. Das Bakterium wurde auf festen Nährböden vereinzelt, bis die Kolonien und das mikroskopische Bild der Zellen einheitlich aussahen.

3.1.3. Verwertung von Naphthalin-1-sulfonsäure und Versuche zum Cometabolismus von Naphthalindisulfonsäuren

Die unter 3.1.2. beschriebene kontinuierliche Mischkultur sollte nach der Isolierung von NS-2-Verwertern an Naphthalin-1-sulfonsäure (NS-1) adaptiert werden. Es wurde neben 2-Sulfonsäure zusätzlich das 1-Isomere eingespeist. Als NS-1/NS-2 -Gemisch wurde dabei käufliche Naphthalin-1-sulfonsäure der Fa. Fluka, Buchs, Schweiz, eingesetzt (2 g/l), die zu etwa einem Drittel aus dem 2-Isomeren bestand (lt. HPLC-Analyse; als Vergleichssubstanzen dienten dabei reine Produkte der Fa. Bayer, Leverkusen). Die optische Dichte der Mischpopulation lag bei konstantem Zulauf des substrathaltigen Mineralmediums (70 ml/24 Std.) bei 1,9. Die Kulturflüssigkeit wurde jede Woche mit der HPLC analysiert. Dabei zeigte sich, daß NS-1 zunächst nur zu 10 %, bei weiterem Betrieb jedoch zunehmend, und schließlich nach 3 Monaten Laufzeit des Chemostaten mit NS-1 bei gleichbleibenden Bedingungen vollständig abgebaut wurde.

Zur Isolierung der dafür verantwortlichen Bakterien wurde die Mischpopulation in verschiedenen Verdünnungsstufen auf festen Komplexnährböden (Nutrient Broth) ausplattiert. Nach zweitägiger Inkubation bei 30° wurden etwa 50, möglichst verschiedenartig

erscheinende Kolonien auf frische Platten übertragen. Mit sterilen Samtstempeln (LEDERBERG und LEDERBERG, 1952) wurde auf NS-2-, NS-1- bzw. naphthalinhaltigen Nährböden überimpft. Von diesen Stämmen konnten 21 ausschließlich Naphthalin, 6 ausschließlich NS-2 und nur einer (wahrscheinlich der schon vorher isolierte Stamm A 3) beide Substrate verwerten. Der Rest zeigte auf keiner der angebotenen Kohlenstoffquellen nennenswertes Wachstum. Auf NS-1-haltigen Nährböden konnte innerhalb von 14 Tagen keinerlei Wachstum festgestellt werden. Aus diesem Grund sollten die isolierten Stämme in Rollröhrchen auf dem im Chemostaten verwendeten Mineral-Naphthalinsulfonsäure-Medium in Gegenwart von Naphthalin angezogen werden. In der zellfreien Kulturflüssigkeit sollte mit der HPLC die zum Cometabolismus befähigten Kulturen von NS-1 erkannt werden. Nach 3tägiger Inkubation auf dem Rollbebrüter bei 30° war in 28 Röhrchen Wachstum feststellbar, der Cometabolismus der NS-1 konnte jedoch bei keinem der isolierten Stämme nachgewiesen werden.+

Zur Überprüfung, ob wirklich die für den Umsatz von NS-1 verantwortlichen Bakterien isoliert worden waren, wurden die Kulturen mit dem technischen NS-2 -Gemisch der Fa. Fluka als Kohlenstoffquelle in einem neuen Chemostaten wiedervereinigt. Diese kontinuierliche Kultur zeigte nach 7 Tagen Betrieb die gleiche Abbauleistung gegenüber dem NS-1/NS-2 -Gemisch wie die Ausgangspopulation.

Die wiedervereinigte Kultur wurde zur Entscheidung, ob Cometabolismus oder Substratverwertung vorlag, ganz auf reine NS-1 als einzige Kohlenstoffquelle umgestellt. Als Substrat diente ein reines Produkt der Fa. Bayer, Leverkusen. Tatsächlich wurde das 1-Isomere als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle verwertet. Ausstriche dieser Mischkultur auf Mineralagarplatten mit NS-1 erbrachten selbst nach 1monatiger Inkubation bei 30° nur sehr kleine Kolonien. Ein wachstumsfördernder Einfluß von Vitamin B 12 oder Hefeextrakt wurde nicht gefunden.

+ Möglicherweise läßt sich ein Cometabolismus von NS-1 unter den gewählten Bedingungen nicht messen, da NS-2 und besonders Naphthalin als potente kompetitive Inhibitoren der ersten Abbauenzyme auftreten könnten. Bei Untersuchungen mit Stamm A 3 zeigte sich, daß der Umsatz der NS-2 in Gegenwart von Naphthalin reversibel gehemmt wurde.

Da ein für den Umsatz von NS-1 verantwortliches Bakterium nicht isoliert werden konnte, sollte die Verwertung des Substrats sowie Cometabolismus von Naphthalindisulfonsäuren durch die wiedervereinigte Mischpopulation in statischer Kultur geprüft werden. Es wurden in einem zweiten Chemostaten, wie unter 2.5.2. beschrieben, größere Zellmengen auf Naphthalin-2-sulfonsäure angezogen. Die abzentrifugierten, in Puffer resuspendierten Zellen wurden zum einen mit dem Naphthalinmonosulfonsäuren-Gemisch (70 % NS-1 + 30 % NS-2; Fa. Fluka; s. o.) zum anderen nur mit dem 2-Isomeren unter statischen Bedingungen inkubiert. Die Substratabnahme wurde mit der HPLC verfolgt (Abb. 4).

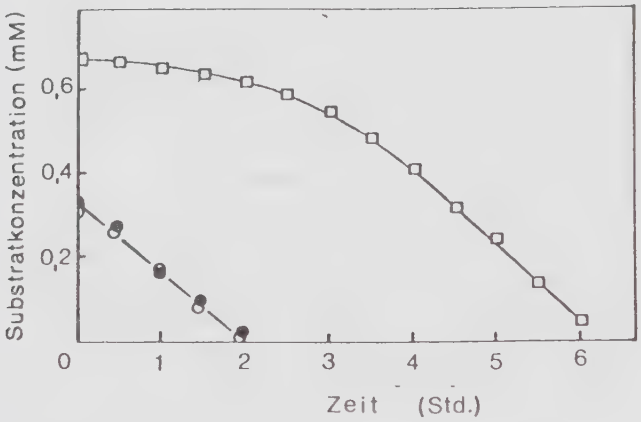


Abb. 4 Umsatz von Naphthalin-1- und -2-sulfonsäure durch ruhende Zellen einer Bakterienmischpopulation

Zellen einer Anreicherungsmischkultur (Erläuterungen s. Text) wurden abzentrifugiert und in 50 ml Phosphatpuffer (80 mM; pH 7,4) resuspendiert (OD_{546} = 8,4). Es wurde in Gegenwart eines NS-1/NS-2 -Gemisches (1 mM; Fa. Fluka; 70 % 1-Isomeres und 30 % NS-2 enthaltend) auf dem Rundschüttler bei 30° inkubiert. In Abständen von 30 Min. wurden Proben entnommen und jeweils 5 µl mit der HPLC analysiert. Die unteren Kurven, beginnend mit einer Ausgangskonzentration von 0,3 mM beschreiben jeweils die Abnahme der NS-2 allein (●) und in Gegenwart von NS-1 (○). Die Abnahme von NS-1 unter letzteren Bedingungen (NS-1 + NS-2) wird durch die Kurve □ beschrieben.

Die Abbildung verdeutlicht, daß für den Umsatz von NS-2 und NS-1 nur ein Enzym verantwortlich zu sein scheint. Offensichtlich wurde der Abbau des 1-Isomeren durch die Gegenwart des 2-Isomeren gehemmt (vgl. Fußnote S. 29). Erst nachdem die 2-Sulfonsäure verbraucht war, kam der Umsatz der NS-1 in Gang und erreichte schließlich die Umsatzgeschwindigkeit der NS-2. Ferner ist ersichtlich, daß umgekehrt die NS-1 den Umsatz des 2-Isomeren nicht beeinflußte.

In einem analogen Experiment wurden, wie unter 2.5.2. beschrieben, Naphthalindisulfonsäuren mit ruhenden Zellen derselben Mischpopulation bei 30° inkubiert. Die 1,5- und 2,7- bzw. die 1,4- und 1,6-Isomeren wurden jeweils in einem Ansatz vereinigt, da sich diese Stoffkombinationen mit Hilfe der HPLC trennen und damit gleichzeitig analysieren ließen. Parallel wurden Ansätze ohne Zellen geschüttelt, um eventuelle chemische Veränderungen der Substrate zu erkennen. Um die bei der HPLC über längere Zeiträume auftretenden Peakschwankungen zu eliminieren, wurden die Nullproben eingefroren und jeweils als Standard verwendet. Die Konzentrationen der Disulfonsäuren in der Kulturflüssigkeit wurden in Abständen von einer Woche gemessen (Abb. 5).

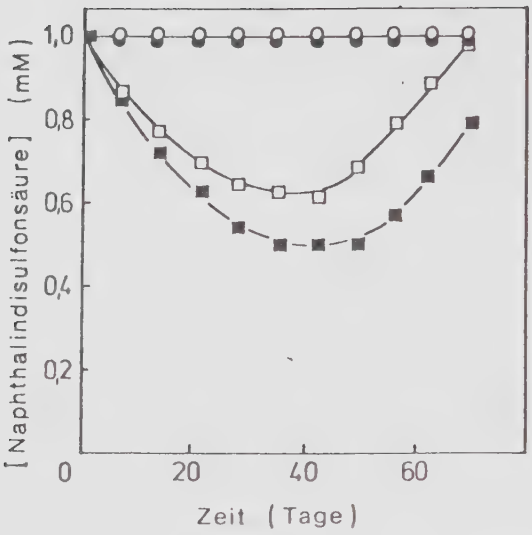


Abb. 5 Cooxidation von Naphthalindisulfonsäuren durch eine Bakterienmischkultur

Zellen einer Anreicherungsmischkultur, die auf NS-1 als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wuchsen, wurden abzentrifugiert und in 50 ml Phosphatpuffer (80 mM; pH 7,4) resuspendiert (OD_{546} = 8,5). Durch Zugabe von je zwei durch HPLC voneinander trennbaren Naphthalindisulfonsäuren (die 1,5- und 2,7- bzw. die 1,4- und 1,6-Isomeren; jeweils 1 mM) wurden die Reaktionen bei 30° auf dem Rundschüttler gestartet. In Abständen von 7 Tagen wurden Proben entnommen und mit der HPLC analysiert. Die Kulturgefäße waren zur Vermeidung von Flüssigkeitsverlusten mit Gummikappen versehen. Die Probenentnahme erfolgte durch eine Kanüle mit Absperrhahn. Dargestellt sind die Konzentrationen von 1,4- (●); 1,6- (○); 1,5- (□) und 2,7-Naphthalindisulfonsäure (■) zu verschiedenen Zeitpunkten.

Zunächst wurde die Konzentration von zwei der vier eingesetzten Naphthalindisulfonsäuren deutlich herabgesetzt, während die der anderen beiden unverändert blieb. Die Cooxidation der 1,5- und 2,7-Isomeren war jedoch nur vorgetäuscht, da bei längerer Inkubationsdauer wahrscheinlich durch Lysis der Zellen die Konzentration der Disulfonate wieder zunahm.

3.1.4. Zusammenfassung der Ergebnisse der Anreicherungsexperimente

Naphthalinsulfonsäuren abbauende Bakterien konnten mit Hilfe einer kontinuierlichen Kultur angereichert werden. Die Störung durch Protozoen wurde mit Cycloheximid ohne Schädigung der bakteriellen Mischpopulation zurückgedrängt. Es konnten Mikroorganismen isoliert werden, die Naphthalin-2-sulfonsäure als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerteten. Naphthalin-1-sulfonsäure wurde zwar durch eine Mischpopulation vollständig abgebaut und verwertet, jedoch scheiterte die Isolierung von Reinkulturen an der sehr geringen Wachstumsrate der dafür verantwortlichen Bakterienstämme.

Naphthalindisulfonsäuren wurden von einer NS-2 und NS-1 verwertenden Mischkultur nicht umgesetzt. Das 1,5- und das 2,7-Isomere wurden teilweise adsorbiert und nach Lysis der Zellen freigesetzt.

Die Stämme A 1 und A 3 zeichneten sich durch rasches Wachstum gegenüber anderen im Rahmen dieser Arbeit isolierten Sulfonsäure-Abbauern aus. Der Stamm A 1 versprach Aufklärung über den Abbauweg von NS-2, da dieser beim Wachstum Metabolite in die Kulturflüssigkeit ausschied. Der Stamm A 3 schien besonders in Bezug auf den Desulfonierungsmechanismus interessant zu sein, da er im Gegensatz zu Stamm A 1 zusätzlich den Grundkörper Naphthalin verwerten konnte. Beide Bakterienstämme sollten im folgenden näher untersucht werden.

3.2. Charakterisierung der isolierten Mikroorganismen

Die neu isolierten Bakterienstämme A 1 und A 3 zeigten rasches Wachstum auf Naphthalin-2-sulfonsäure (NS-2) als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle und schienen für grundlegende Untersuchungen zur Problematik der Persistenz von aromatischen Sulfonsäuren geeignet. Sie sollten zunächst bezüglich der Abbauwege des NS-2 charakterisiert und taxonomisch eingeordnet werden.

3.2.1. Beschreibung der neu isolierten Bakterienstämme

Der Stamm A 1, der wie unter 3.1.1. beschrieben isoliert wurde, wuchs auf festem Naphthalin-2-sulfonsäure-Mineralagar aerob in runden, glatten, kräftiggelben Kolonien. Nach 6 Tagen Inkubation bei 30° erreichten diese einen Durchmesser von ca. 2 mm. Die gram-negativen kurzen Stäbchen waren durch polar polytriche Begeißlung beweglich. Sie waren nicht zur Poly-β-hydroxybuttersäure (PHB)-Speicherung befähigt und bildeten beim Wachstum auf Nährböden nach KING et al. (1954) fluoreszierende Pigmente, jedoch keine Phenazin-Farbstoffe. Nitrat wurde weder aerob noch anaerob reduziert; zum Wachstum lag kein Methioninbedürfnis vor. Das Bakterium wuchs bei 4°, nicht jedoch bei 41°; Gelatine und Stärke wurden im Gegensatz zu PHB abgebaut; Katalase- und Oxidase-Reaktion waren positiv; der Argenindihydrolase-Test war negativ. Auf Naphthalin-2-sulfonsäure angezogene Zellen spalteten Brenzkatechin über den meta-Weg; auf p-Hydroxybenzoat konnte das Bakterium nicht wachsen.

Auf festem Mineralagar mit Naphthalin-2-sulfonsäure als Kohlenstoff- und Energiequelle wuchs der durch Voranreicherung auf Naphthalin gewonnene Stamm A 3 (vgl. 3.1.2.) aerob in runden, glänzenden, farblosen Kolonien, die nach 4 Tagen Inkubation bei 28° einen Durchmesser von 2 mm hatten. Die stäbchenförmigen Zellen waren gram-negativ und durch polar polytriche Begeißlung

sehr gut beweglich. Sie konnten PHB speichern. Farbstoffe wurden auf Nährböden nach KING et al. (1954) nicht gebildet; Methionin wurde zum Wachstum nicht benötigt; Nitrat wurde weder aerob noch anaerob reduziert. Bei 4° und 41° war kein Wachstum zu beobachten. Der Stamm konnte PHB abbauen, nicht jedoch Gelatine oder Stärke. Oxidase- und Katalase-Reaktion waren positiv; eine Arginindihydrolase-Aktivität konnte nicht festgestellt werden. Auf p-Hydroxybenzoat angezogene Zellen konnten Protocatechusäure nicht umsetzen.

Die Stämme A 1 und A 3 sind offensichtlich Pseudomonaden und sollen im folgenden einer näheren taxonomischen Studie unterzogen werden.

3.2.2. Bestimmung der Hauptgruppenmerkmale

Pseudomonaden stellen eine wichtige Familie der Eubakterien dar. Sie lassen sich nur schwer taxonomisch einordnen. STANIER et al. (1966) beschrieben die Aufteilung einer Vielzahl von Pseudomonas-Stämmen in eine relativ kleine Anzahl von Gruppen. Diese stellen die Hauptmerkmale („general characters of diagnostic value") der Bakterien dar. So ließen sich 267 verschiedene Stämme in 10 Gruppen gliedern. Für 3 weitere Gruppen wurden die Daten von anderen Autoren übernommen. PALLERONI et al. (1970) untersuchten unter ähnlichen Aspekten die denitrifizierenden Pseudomonaden und stellten für diese spezifiziertere Gruppen zusammen. Die Auswahl der Hauptgruppenmerkmale ist bei STANIER et al. (1966) eingehend begründet. Es wurde nach den gleichen Methoden wie dort angegeben gearbeitet. Die Tabelle der Hauptgruppenmerkmale (Tab. 1) wurde direkt übernommen und nur um die Befunde für die Stämme A 1 und A 3 erweitert.

Tab. 1 Hauptgruppenmerkmale der Pseudomonaden nach STANIER et al. (1966)

Pseudomonas Spezies / Hauptgruppenmerkmal	P. aeruginosa	P. fluorescenz	P. putida	P. multivorans	P. pseudomallei	P. mallei	P. acidovorans	P. testosteroni	P. alcaligenes	P. pseudoalcaligenes	P. stutzeri	P. maltophilia	P. lemoignei	Stamm A 1	Stamm A 3
Anzahl der Geißeln	1	>1	>1	>1	>1	0	>1	>1	1	1	1	>1	1	>1	>1
PHB-Speicherung	-	-	-	+	+	+	+	+	-	v	-	-	+	-	+
Fluoreszierendes Pigment	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Phenazin-Pigment	+	v	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methioninbedürfnis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Denitrifikation	+	v	-	-	+	v	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Wachstum bei 4°	-	+	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Wachstum bei 41°	+	-	-	v	+	+	-	-	+	+	v	-	-	-	-
Gelatine-Abbau	+	+	-	+	+	+	-	-	+	v	+	+	-	+	-
PHB-Abbau	-	-	-	-	+	+	-	v	-	-	-	-	+	-	+
Stärke-Abbau	-	-	-	-	+	v	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Oxidase-Reaktion	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Arginindihydrolase	+	+	+	-	+	+	-	-	+	v	-	-	-	-	-

Die Tabelle nach STANIER et al. (1966) wurde um die Eigenschaften der Stämme A 1 und A 3 erweitert. Verfügt der Stamm über die aufgeführten Kriterien, so wurde das mit +, im anderen Fall mit - symbolisiert. Eine Spezies ist mit v gekennzeichnet, wenn bei ihren Stämmen beide Möglichkeiten auftraten. Bei der Anzahl der Geißeln wird differenziert zwischen geißellos (0), monotrich (1) und polytrich (>1).

3.2.3. Untersuchungen zur Substratverwertung

Pseudomonaden sind durch die Vielzahl der organischen Verbindungen, die sie als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten können, gekennzeichnet. Dabei gibt es einige Universalsubstrate, die von fast allen Pseudomonaden genutzt werden können. Es sind dies Säuren des Citratzyklus, mehrere niedere Fettsäuren und einige Aminosäuren. Andere Substrate scheinen artspezifisch zu sein. STANIER et al. (1966) nutzten dies, um die ihnen zur Verfügung stehenden Stämme nach der Substratverwertung zu ordnen, und fanden auch hier eine befriedigende Übereinstimmung bei den nach Tab. 1 eingeteilten Pseudomonas Spezies. Es schien daher sinnvoll, die Verwertung der bei den Autoren aufgeführten organischen Verbindungen durch die Stämme A 1 und A 3 zu prüfen. Das Ergebnis ist in Tab. 2 (s. S. 38) zusammengefaßt.

3.2.4. Vergleich der isolierten Stämme mit anderen Pseudomonaden

In den Tabellen 1 und 2 sind 38 Merkmale aufgeführt, die für die Pseudomonaden-Bestimmung von diagnostischem Wert sind. Sie sind als Alternativentscheidungen (+ oder -) angegeben. Die Auswertung möglichst vieler solcher Merkmale, die alle gleichrangig sein sollen, ist Ziel der numerischen Taxonomie. Im Rahmen dieser Arbeit sollte anhand der 38 untersuchten Eigenschaften ein Verwandtschaftsgrad der neu isolierten Stämme mit anderen Pseudomonas-Arten ermittelt werden. Das Ergebnis ist aus Tab. 3 (s. S. 39) ersichtlich. Bei Angaben wie variabel und manchmal positiv konnte keine Alternativentscheidung gefällt werden. Diese Merkmale wurden als übereinstimmend gewertet.

Tab. 2 Substratverwertungsspektrum zur Pseudomonaden-bestimmung nach STANIER et al. (1966)

Substrat \ Pseudomonas Spezies	P. aeruginosa	P. fluorescenz	P. putida	P. multivorans	P. pseudomallei	P. mallei	P. acidovorans	P. testosteroni	P. alcaligenes	P. pseudoalcaligenes	P. stutzeri	P. maltophilia	P. lemoigneï	Stamm A 1	Stamm A 3
D-Fucose	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
Trehalose	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Cellobiose	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Maltose	-	-	-	(+)	+	v	-	-	-	-	+	+	-	+	-
Stärke	-	-	-	-	+	v	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Inositol	-	+	-	+	+	+	v	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	+	+	(+)	+	+	+	+	-	-	-	v	-	-	-	-
Geraniol	+	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-
2-Ketogluconat	+	+	+	+	+	v	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Maleat	-	(+)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Glykolat	-	(+)	(+)	v	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
DL-Lactat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Pelargonat	+	+	+	+	+	v	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Adipat	+	v	-	+	+	v	+	+	-	-	(+)	-	-	-	+
m-Hydroxybenzoat	-	(+)	(+)	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Testosteron	-	(+)	(+)	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Acetamid	+	-	v	v	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arginin	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
DL-Valin	+	+	+	v	+	v	-	-	-	-	+	-	-	-	-
DL-Norleucin	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
D-Tryptophan	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
δ-Aminovalerat	+	v	+	+	+	v	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Betain	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	(+)	-	-	+	-
Putrescin	+	+	+	+	+	v	-	-	-	+	+	-	-	-	-

In der Tabelle nach STANIER et al. (1966) wurden die Daten für die Stämme A 1 und A 3 zusätzlich aufgeführt. Die Symbole geben an, ob das Substrat als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden kann. Dabei bedeutet + positives; - negatives; (+) manchmal positives Wachstum auf Agarplatten. Bei v = variabel treten innerhalb einer Spezies beide Alternativen auf.

Tab. 3 Verwandtschaftsgrad der neu isolierten Bakterienstämme mit den bei STANIER et al. (1966) aufgeführten Pseudomonaden

Pseudomonas Spezies	übereinstimmende Eigenschaften		Verwandtschaftsgrad (%)	
	Stamm A 1	Stamm A 3	Stamm A 1	Stamm A 3
P. aeruginosa	17	15	44,8	39,5
P. fluorescenz	25	23	66,0	60,5
P. putida	24	24	63,2	63,2
P. multivorans	21	25	55,4	66,0
P. pseudomallei	20	16	52,7	42,1
P. mallei	26	23	68,5	60,5
P. acidovorans	17	29	44,8	76,4
P. testosteroni	21	36	55,4	94,8
P. alcaligenes	23	23	60,5	60,5
P. pseudoalcaligenes	24	24	63,2	63,2
P. stutzeri	28	22	73,6	58,0
P. maltophilia	30	24	79,0	63,2
P. lemoignei	26	30	68,5	79,0

Erläuterungen s. Text.

Aus Tab. 3 geht hervor, daß eine Zuordnung für den neu isolierten Bakterienstamm A 1 nur schwer möglich war. Mit Pseudomonas maltophilia stimmten 79 % der Merkmale überein. Ein Vergleich mit einem idealen Phänotyp dieser Art lieferte jedoch nur unbefriedigende Ergebnisse (Tab. 4).

Tab. 4 Eigenschaften von Pseudomonas maltophilia

Gruppencharakter	idealer Phänotyp	Stamm A 1
1. Methionin Bedürfnis	+	-
2. Oxidase-Reaktion	-	+
3. Denitrifikation	-	-
Verwertung von:		
4. D-Lactose	+	-
5. Cellobiose	+	+
6. L-Aspartat	-	+
7. β-Hydroxybutyrat	-	-
8. Glutarat	-	?
9. Glycerin	-	+
10. Maltose	+	+

Der ideale Phänotyp wurde von STANIER et al. (1966) aus 23 Stämmen ermittelt. Wachstum auf den angegebenen Substraten ist durch +, keine Verwertung durch - ausgedrückt. Nicht durchgeführte Wachstumsversuche sind mit ? symbolisiert. Methioninbedürfnis, positive Oxidase-Reaktion bzw. Fähigkeit zur Denitrifizierung ist mit +, das Fehlen dieser Eigenschaften mit - gekennzeichnet.

Aus Tab. 3 (s. S. 39) ist weiter ersichtlich, daß Stamm A 1 auch zu 73,6 % mit Pseudomonas stutzeri verwandt ist. Ein Vergleich der beiden zeigte jedoch ebenfalls unbefriedigende Übereinstimmung (Tab. 5).

Tab. 5 Eigenschaften von *Pseudomonas stutzeri*

Gruppencharakter	idealer Phänotyp	Stamm A 1
1. Monotriche Begeißlung	+	-
2. Denitrifikation	+	-
Verwertung von:		
3. L-Arabinose	-	-
4. D-Galaktose	-	+
5. Cellobiose	-	+
6. Maltose	+	+
7. Stärke	+	+
8. 2-Ketogluconat	-	-
9. Propylenglykol	+	?
10. Glykolat	+	-
11. p-Hydroxybenzoat	-	-
12. β-Alanin	-	+
13. L-Histidin	-	-

Der ideale Phänotyp wurde von STANIER et al. (1966) aus 17 Stämmen ermittelt. Wachstum auf den angegebenen Substraten ist mit +, keine Verwertung mit - symbolisiert. Nicht durchgeführte Wachstumsversuche sind mit ? gekennzeichnet. Monotriche Begeißlung und die Fähigkeit zur Denitrifikation sind durch + oder im anderen Fall durch - ausgedrückt.

Beide Pseudomonas-Arten sowie die anderen bei STANIER et al. (1966) diskutierten waren nicht hinreichend verwandt mit Stamm A 1, um ihn einer dieser Gruppen zuordnen zu können. Es wurde daher im Rahmen dieser Arbeit auf eine spezifiziertere Benennung des Bakteriums verzichtet und die vorläufige Bezeichnung *Pseudomonas* sp. A 1 beibehalten.

Das zweite neu isolierte Bakterium (Stamm A 3) zeigte sich nach der numerischen Taxonomie zu 94,8 % mit der Pseudomonas testosteroni-Spezies verwandt. Ein weitergehender Vergleich mit einem von STANIER et al. (1966) aus 26 Stämmen ermittelten idealen Phänotyp der P. acidovorans-Gruppe - zu der P. testosteroni gehört - zeigte weiterhin gute Übereinstimmung (Tab. 6).

Tab. 6 Eigenschaften der Pseudomonas acidovorans-Gruppe

Gruppencharakter	idealer Phänotyp	Stamm A 3
1. PHB-Speicherung	+	+
Verwertung von:		
2. L-Arabinose	-	-
3. D-Glucose	-	-
4. D-Galaktose	-	-
5. 2-Ketogluconat	-	+
6. Saccharat	+	?
7. Pelargonat	-	-
8. Sebacat	+	-
9. Glykolat	+	+
10. Lävulinat	+	+
11. Itaconat	+	?
12. m-Hydroxybenzoat	+	+
13. Norleucin	+	+
14. Putrescin	-	-

Der ideale Phänotyp wurde von STANIER et al. (1966) aus 26 Stämmen ermittelt. Waren die aufgeführten Kriterien vorhanden, so ist das durch +, im anderen Fall durch - ausgedrückt. Nicht durchgeführte Wachstumsversuche sind mit ? gekennzeichnet.

Die Autoren gaben darüberhinaus Wachstumssubstrate an, die eine Differenzierung zwischen beiden Stämmen gestatten (Tab. 7).

Tab. 7 Unterschiede in der Substratverwertung durch Pseudomonas acidovorans, Pseudomonas testosteroni und Stamm A 3

Wachstumssubstrat	P. acidovorans	P. testosteroni	Stamm A 3
D-Fructose	+	-	-
Mannitol	+	-	-
Malonat	+	-	-
Maleat	+	-	-
L-Tartrat	+	-	-
Chinat	+	-	?
Äthanol	+	-	-
Phenylacetat	+	-	-
D-Tryptophan	+	-	-
L-Tryptophan	+	-	-
Benzoylformiat	-	+	+
Benzoat	-	+	-
β-Alanin	+	-	+
DL-α-Aminobutyrat	+	-	?
γ-Aminobutyrat	+	-	?
δ-Aminovalerat	+	-	-
Acetamid	+	-	-
Testosteron	-	+	+

Das Wachstum von P. acidovorans und P. testosteroni auf den angegebenen Substraten wurde von STANIER et al. (1966) ermittelt. Die Verwertung ist mit +, Nichtumsatz mit - symbolisiert. Nicht durchgeführte Wachstumsversuche sind mit ? gekennzeichnet.

Aus den Daten der Tabellen 3, 6 und 7 geht hervor, daß nach den bei STANIER et al. (1966) aufgeführten Kriterien der Bakterienstamm A 3 eindeutig zugeordnet werden kann. Er soll nach diesen Befunden im folgenden als Pseudomonas testosteroni A 3 bezeichnet werden.

3.2.5. Wachstumsversuche auf weiteren organischen Verbindungen

Die Verwertung einer Vielzahl von organischen Substraten gehört, wie schon erwähnt, zur auffälligsten Eigenart der Pseudomonaden. Es schien daher ein wichtiges Kriterium der Stammcharakterisierung zu sein, das Wachstum auf möglichst vielen Verbindungen zu testen. In Tab. 8 (s. S. 45) sind Substrate aufgeführt, die bei anderer Gelegenheit (s. die Tabellen dieses Kapitels) noch nicht verzeichnet sind. Die Konzentration der eingesetzten Verbindungen war jeweils 0,1 %. Nur bei toxischen Verbindungen, wie 2-Hydroxynaphthalin, wurde diese auf 0,01 % herabgesetzt.

3.2.6. Zusammenfassende Charakterisierung der neu isolierten Mikroorganismen

Bei den neu isolierten Bakterienstämmen handelte es sich um polar begeißelte gram-negative Stäbchen, die aerob wuchsen und keine Sporen bildeten. Taxonomische Untersuchungen zeigten für Stamm A 1 nach den Kriterien von STANIER et al.(1966) keine befriedigende Verwandtschaft mit einer der dort aufgeführten Pseudomonas-Spezies. Er erhielt vorerst die Bezeichnung Pseudomonas sp. A 1. Nach den gleichen Kriterien konnte der Stamm A 3 eindeutig identifiziert werden und wird deshalb mit Pseudomonas testosteroni A 3 bezeichnet.

Tab. 8 Verwertung von zusätzlich getesteten Substraten durch die neu isolierten Bakterienstämme Pseudomonas sp. A 1 und Pseudomonas testosteroni A 3 (Ergänzung zu den Tabellen dieses Kapitels)

Substrat	A 1	A 3	Substrat	A 1	A 3
Benzol	-	-	1-Aminonaphthalin	-	-
Phenol	-	-	1-Bromnaphthalin	-	-
Toluol	-	-	1-Hydroxynaphthalin-2-carbonsäure	-	-
o-Kresol	-	-			
m-Kresol	-	-	Cumarin	-	-
p-Kresol	-	-	Phenylpyruvat	-	-
m-Chlorbenzoat	-	-			
p-Hydroxybenzoat	-	+	Caprylat	-	-
Salicylat	+	+	meso-Tartrat	-	-
Salicylaldehyd	-	-	Gluconat	-	+
2-Hydroxybenzylalkohol	-	-	Succinat	+	+
Anthranilat	-	-	Oxalat	-	-
Gentisinat	+	+			
Homogentisinat	-	+	DL-Ornithin	-	-
Protocatechuat	+	-	DL-Threonin	-	-
Benzolsulfonat	-	-	DL-Serin	-	-
5-Sulfosalicylat	-	-	Glycin	-	+
Naphthalin	-	+	Kreatin	-	-
1-Hydroxynaphthalin	-	-			
2-Hydroxynaphthalin	-	+	Methanol	-	-
2-Methylnaphthalin	-	+	2,3-Butylenglykol	-	-
Naphthalin-1-sulfonsäure	-	-			
Naphthalin-2-sulfonsäure	+	+	Methylamin	-	-
Naphthalin-1-carbonsäure	-	-			
Naphthalin-2-carbonsäure	-	-			

Das Wachstum wurde auf Agarplatten nach den bei STANIER et al. (1966) angegebenen Methoden bestimmt. Die Symbole geben an, ob das Substrat als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden kann (+) oder nicht (-).

3.3. Untersuchungen zum Katabolismus der Naphthalin-2-sulfonsäure

Das Wachstum der neu isolierten Mikroorganismen auf Naphthalin-2-sulfonsäure (NS-2) als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle sollte zunächst optimiert werden. Es sollte nach Metaboliten der NS-2 in der Kulturflüssigkeit gesucht werden, um Anhaltspunkte über die Art des Abbauweges zu erhalten.

3.3.1. Optimierung und Charakterisierung des Wachstums auf Naphthalin-2-sulfonsäure

Bei der Optimierung der Wachstumsbedingungen für beide Bakterienstämme zeigte sich, daß die Mikroorganismen starke Pufferkonzentrationen (80 mM) benötigten, da andernfalls der pH-Wert während des Substratumsatzes stark abfiel und die Kulturen geschädigt wurden. Das Temperaturoptimum lag bei 30°; der optimale pH-Wert bei 7,4; Hefeextrakt oder Vitamin B 12 wurden zum Wachstum nicht benötigt. Die Anzucht in Flüssigkultur auf NS-2 erbrachte bei beiden Stämmen ca. 1,5 g/l Zellen (Naßgewicht).

Um das Wachstum und die Substratverwertung zu verfolgen, wurden NS-2 verwertende Zellen von Pseudomonas sp. A 1 in frischer Nährlösung mit NS-2 als einziger Kohlenstoffquelle resuspendiert. In der Kulturflüssigkeit der stündlich entnommenen Proben wurde die Sulfat- bzw. Substratkonzentration bestimmt. Das Wachstum des Bakteriums auf NS-2 unter Sulfat-Eliminierung ist in Abb. 6 graphisch dargestellt.

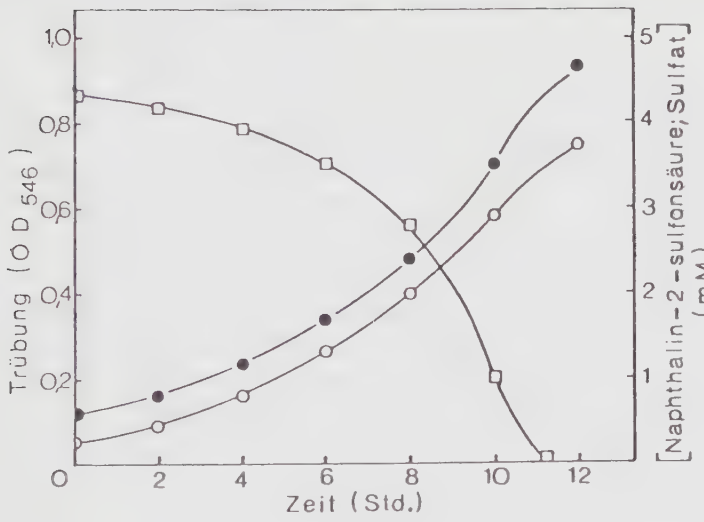


Abb. 6 Wachstum von Pseudomonas sp. A 1 auf Naphthalin-2-sulfonsäure

Auf NS-2 angezogene Zellen von Pseudomonas sp. A 1 wurden abzentrifugiert und zweimal mit Phosphatpuffer (80 mM; pH 7,4) gewaschen. Nach Resuspension in frischer Nährlösung (1 l), die 1 g Substrat enthielt, wurde das Wachstum durch Trübungsmessung verfolgt. Sulfat in der Nährlösung wurde nach der Bariumchloranilat-Methode (vgl. 2.11.), die Abnahme des Substrats mit der HPLC bestimmt. Es wurden stündlich Proben (10 ml) entnommen. Dargestellt ist das Wachstum des Bakteriums anhand von Trübungsmessung (●), die Substratabnahme (□) und die Sulfatausscheidung (o).

In einem analogen Versuch wurde das Wachstum des zweiten neu isolierten Bakteriums Pseudomonas testosteroni A 3 untersucht (Abb. 7).

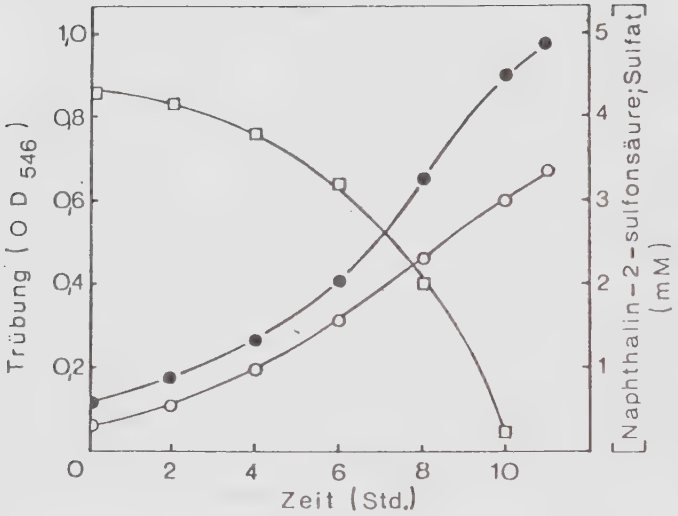


Abb. 7 Wachstum von Pseudomonas testosteroni A 3 auf Naphthalin-2-sulfonsäure

Die Versuchsbedingungen waren die gleichen wie unter Abb. 6 angegeben. Dargestellt ist das Wachstum anhand von Trübungsmessung (●), Die Substratabnahme (□) und die Sulfatausscheidung (○).

Wie aus Abb. 6 und 7 ersichtlich ist, wurde die Sulfonsäuregruppe sowohl von Pseudomonas sp. A 1 als auch von Pseudomonas testosteroni A 3 als Sulfat in die Kulturflüssigkeit ausgeschieden. Die Akkumulation von Sulfit konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. Demnach schienen beide Stämme NS-2 über Naphthalin und Sulfat abzubauen (vgl. 3.1.2.). Zur Bestätigung dieser These sollte der Katabolismus der NS-2 untersucht werden. Es sollte - da von größerer Aussagekraft - das zweite Desulfonierungsprodukt (Naphthalin oder 2-Hydroxynaphthalin) aufgefunden werden.

3.3.2. Isolierung und Identifizierung von Metaboliten bei Umsatz von Naphthalin-2-sulfonsäure durch die neu isolierten Bakterienstämme

Die den Abbau nichtphenolischer Aromaten einleitenden mischfunktionellen Dioxygenasen der Bakterien sind in zellfreien Extrakten schwer nachweisbar. Auch im Falle der neu isolierten Bakterien war bei Inkubation zellfreier Extrakte mit NS-2 ein Umsatz des Substrates nicht meßbar, obwohl Pseudomonas sp. A 1 äußerst schonend mit Lysozym aufgeschlossen werden konnte. Als Enzymtestmethoden wurden HPLC, Warburgtechnik, Sauerstoffelektrode und optische Messungen versucht. Die nachfolgenden Untersuchungen mußten daher mit ganzen Zellen durchgeführt werden. Es war zweckmäßig, bei Versuchen zur Aufklärung des Katabolismus der NS-2, Ruhezellen (d. h. Zellen der logarithmischen Wachstumsphase, die ohne Stickstoffquelle inkubiert wurden) zu verwenden, da sie größere Mengen an Metaboliten akkumulierten als wachsende Bakterien.

Bei einem solchen Experiment wurde auf NS-2 angezogene Zellen von Pseudomonas sp. A 1, wie unter 2.5.1. beschrieben, mit neuem Substrat inkubiert. Die NS-2-Abnahme bzw. die Metabolitzunahme wurde durch Analyse der Kulturflüssigkeit mit Hilfe der HPLC (vgl. 2.12.1.) ermittelt und optimiert. Ein Chromatogramm der Kulturflüssigkeit ist in Abb. 8 wiedergegeben.

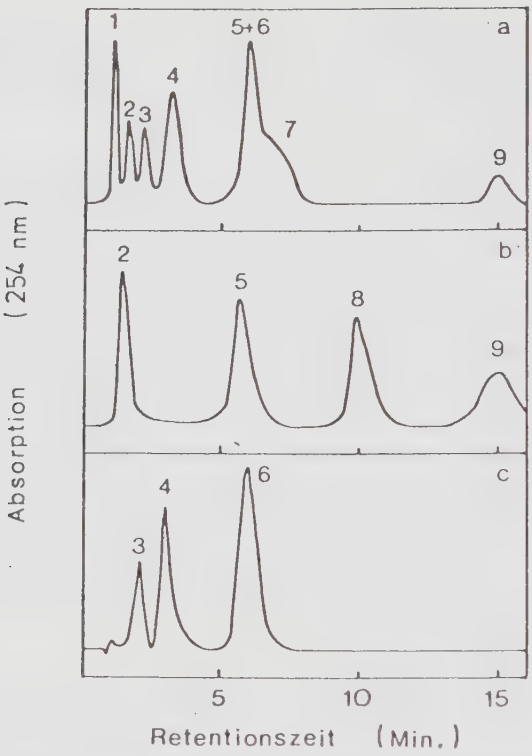


Abb. 8 Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie von Kulturflüssigkeiten nach Umsatz von Naphthalin-2-sulfonsäure durch ruhende Zellen von Pseudomonas sp. A 1

Auf NS-2 angezogene Zellen von Pseudomonas sp. A 1 wurden in 6 l Phosphatpuffer (80 mM; pH 7,4) resuspendiert (OD_{546} = 1,5) und mit 12 g NS-2 5 Std. im Fermenter bei 30° inkubiert. Der Substratumsatz und die Metabolitausscheidung wurden durch direkte Analyse der Kulturflüssigkeit mit der HPLC verfolgt. Nachdem die Metabolitkonzentration nicht mehr zunahm, wurde das Überstehende der Kultur neutral und sauer mit Äther extrahiert. Zur Analyse der organischen Phasen wurde jeweils ein Teil in Methanol aufgenommen und mit der HPLC aufgetrennt. (Die Zahlen an den Peaks sind im Text erläutert).

a. HPL-Chromatogramm der Kulturflüssigkeit nach Abtrennen der Zellen unmittelbar vor der Ätherextraktion

b. HPLC der Produkte der neutralen Ätherextraktion

c. HPLC der Produkte der sauren Ätherextraktion

Das Chromatogramm zeigt, daß NS-2 fast vollständig umgesetzt worden war und nur noch ein Rest als Schulter (7) im Diagramm zu erkennen ist. Die Peaks 2, 3, 4, 5, 6 und 9 sind Metaboliten zuzuordnen, deren Isolierung und Identifizierung angestrebt wurde. Peak 1 enthält stark polare Substanzen, u. a. alle anorganische Salze, und beruht weniger auf Absorption als auf Refraktion des Eluates.

Nachdem die Produktpeaks ihre maximale Höhe erreicht hatten (Abb. 8), wurden die Zellen abzentrifugiert. Das Überstehende der Kultur wurde, wie unter 2.14.1. beschrieben, mit Diäthyläther direkt im Fermenter zuerst unter neutralen und anschließend unter sauren Bedingungen extrahiert. Mit ersterem wurden nichtazide Verbindungen in die organische Phase überführt. Ein HPL-Chromatogramm dieser Ätherfraktion ist in Abb. 8b wiedergegeben. Es fällt ein „neuer" Peak auf, bei dem es sich augenscheinlich um einen Artefakt handelt (wahrscheinlich um Zell-Lipide), da dieser vor der Extraktion nicht auftrat (vgl. Abb. 8). Das Chromatogramm des sauren Extraktes, der die aziden Verbindungen der Kulturflüssigkeit enthielt, ist in Abb. 8c aufgezeichnet. Ein Kontroll-Chromatogramm der Kulturflüssigkeit nach der Extraktion zeigte nur noch einen Peak für NS-2.

3.3.2.1. Charakterisierung nichtazider Metabolite

Der neutrale Ätherextrakt wurde eingeengt und mit Hilfe der präparativen Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Im Fließmittelsystem I traten vier Banden auf, wobei eine nahezu mit der Fließmittelfront wanderte, die anderen drei Rf-Werte von 0,6; 0,5 und 0,3 zeigten.

Die erste Bande (Rf 0,9) war nach UV-, DC- und IR-Daten identisch mit 2,6-Di-tertiär-butyl-p-kresol, welches von der Fa. Merck, Darmstadt, dem Diäthyläther als Stabilisator zugesetzt wird (5 mg/l).

Die beiden mittleren Banden (Rf 0,6 und 0,5) wurden unvollständig aufgetrennt, was Rechromatographie im Fließmittelsystem II erforderte. Nach vollständiger Trennung wurden diese mit Äther eluiert und getrennt aufgearbeitet. Nach Geruch, UV-Spektrum, Rf-Wert und Retentionszeit bei der HPLC war die schneller wandernde Substanz identisch mit Salicylaldehyd (Peak 5 in Abb. 8). Die authentische Verbindung und der Metabolit zeigten beide die gleiche einer Phenolatbildung entsprechende spektrale Verschiebung bei Zugabe von KOH. Aus beiden waren 2,4-Dinitrophenylhydrazone darstellbar, die nach Umkristallisation aus Äthanol unter Zersetzung bei 250° schmolzen und durch Dünnschichtchromatographie nicht unterscheidbar waren. Die Eigenschaften der beiden Stoffe sind in Tab. 9 gegenübergestellt.

Tab 9 Identifizierung von Salicylaldehyd als Ausscheidungsprodukt beim Umsatz von Naphthalin-2-sulfonsäure durch Ruhezellen von Pseudomonas sp. A 1

Methode	isolierte Substanz	Salicylaldehyd (authentische Probe)
freie Verbindung		
Retentionszeit bei HPLC (Min.) (Peak Nr. 5 in Abb. 8)	5,8	5,8
Rf-Wert bei DC Fließmittelsystem II	0,61	0,60
UV-Spektrum in Methanol (λ_{max}; nm)	323; 256	324; 256
Bathochromer Effekt durch KOH-Zugabe (λ_{max}; nm)	375; 263	377; 265
2.4-Dinitrophenylhydrazon		
Schmelzpunkt Mischprobe	250° (Zers.)	250° (Zers.) 250° (Zers.)
Rf-Wert bei DC Fließmittelsystem II	0,57	0,55

Die Versuchsbedingungen bei HPLC- und DC-Analysen gehen aus 2.12.1. bzw. 2.12.2. hervor. Die Fließmittelsysteme sind in Tab. 16 und 17 im Anhang zusammengefaßt.

Der im Fließmittelsystem II langsamer wandernde Metabolit (Rf 0,2) der neutralen Ätherfraktion zeigte nach Abdampfen des Lösungsmittels ein UV-Spektrum mit Absorptionsmaxima bei 264; 274 und 285 nm (in Methanol). Durch Zugabe von 0,1 ml KOH (1 N in Methanol) trat ebenfalls eine bathochrome Verschiebung der Maxima nach 273; 282 und 293 nm ein. Der Metabolit ließ sich, wie unter 2.14.2. beschrieben, acetylieren. Das Derivat kristallisierte nach Abdampfen des Lösungsmittels im Kolben aus. Nach Umkristallisation aus Äthanol schmolz die acetylierte Verbindung bei 67°. Der Mischschmelzpunkt mit authentisch dargestelltem 2-Acetoxynaphthalin betrug 66°. Beide Verbindungen zeigten im IR-Spektrum die gleichen Absorptionen und hatten identische Rf-Werte bei der DC (0,6 im Fließmittelsystem I).

Authentisches 2-Hydroxynaphthalin zeigte das gleiche UV-Spektrum in Methanol wie die isolierte Substanz; die Absorptionen wurden bei Zugabe von KOH charakteristisch bathochrom verschoben. Beide Verbindungen lieferten die gleichen Retentionszeiten bei der HPLC (Peak 9 in Abb. 8). Die Daten sind in Tab. 10 (s. S. 54) zusammengefaßt.

Die vierte Bande der neutralen Ätherfraktion (Rf 0,3 im Fließmittelsystem I) wurde mit Diäthyläther eluiert und kristallisierte beim Abdampfen des Lösungsmittels im Kolben aus. Eine Probe der isolierten Substanz in Methanol zeigte im UV-Spektrum Absorptionen bei 275 nm und 225 nm. Durch KOH wurden diese nach 288 bzw. 240 nm verschoben. Gleiche Spektren konnten mit synthetischem Brenzkatechin erzeugt werden. Der isolierte Metabolit und Brenzkatechin zeigten die gleichen Rf-Werte (0,28) im Fließmittelsystem I und die gleiche Retentionszeit bei der HPLC (Peak 2 in Abb. 8). Die nach 2.14.2. dargestellten Diacetylderivate waren aus Äthanol umkristallisierbar und schmolzen beide ebenso wie die Mischprobe bei 64,5°. Die IR-Spektren und Rf-Werte (Fließmittelsystem I) von Diacetoxybrenzkatechin und des diacetylierten Metabolits waren identisch. Die Daten sind in Tab. 11 (s. S. 55) zusammengefaßt.

Tab. 10 Identifizierung von 2-Hydroxynaphthalin als Ausscheidungsprodukt beim Umsatz von Naphthalin-2-sulfonsäure durch Ruhezellen von Pseudomonas sp. A 1

Methode	isolierte Substanz	2-Hydroxynaphthalin (authentische Probe)
freie Verbindung		
Retentionszeit bei HPLC (Min.) (Peak Nr. 9 in Abb. 8)	15	15
Rf-Wert bei DC Fließmittelsystem I	0,41	0,41
UV-Spektrum in Methanol (λ_{max}, nm)	264; 274; 285	265; 275; 285
Bathochromer Effekt durch KOH-Zugabe (λ_{max}, nm)	273; 282; 293	275; 281; 292
Acetylderivat		
Schmelzpunkt Mischprobe	67° 66°	69°
IR-Spektrum in KBr (cm^{-1})	1760; 1380; 1230	1765; 1380; 1235
Rf-Wert bei DC Fließmittelsystem II	0,60	0,61

Die Versuchsbedingungen bei HPLC- und DC-Analysen gehen aus 2.12.1. bzw. 2.12.2. hervor. Die Fließmittelsysteme sind in Tab. 16 und 17 im Anhang zusammengefaßt.

Tab. 11 Identifizierung von Brenzkatechin als Ausscheidungs-Produkt beim Umsatz von Naphthalin-2-sulfonsäure durch Ruhezellen von Pseudomonas sp. A 1

Methode	isolierte Substanz	Brenzkatechin (authentische Probe)
freie Verbindung		
Retentionszeit bei HPLC (Min.) (Peak Nr. 2 in Abb. 8)	1,5	1,5
Rf-Wert bei DC Fließmittelsystem I	0,28	0,26
UV-Spektrum in Methanol (λ_{max}, nm)	275; 225 (s)	274; 225 (s)
Bathochromer Effekt durch KOH-Zugabe (λ_{max}, nm)	288; 240	288; 240
Diacetylderivat		
Schmelzpunkt Mischprobe	64,5°	64,5°
	64,5°	
IR-Spektrum in KBr (cm^{-1})	1765; 1380; 1220	1765; 1380; 1225
Rf-Wert bei DC Fließmittelsystem I	0,42	0,44

Die Versuchsbedingungen bei HPLC- und DC-Analysen gehen aus 2.12.1. bzw. 2.12.2. hervor. Die Fließmittelsysteme sind in Tab. 16 und 17 im Anhang zusammengefaßt.

3.3.2.2. Beschreibung der aziden Metabolite

Der saure Ätherextrakt wurde an präparativer Kieselgel-Schicht im Fließmittelsystem III aufgetrennt. Es wurden zwei Hauptbanden mit Rf-Werten von 0,88 und 0,73 und mehrere andere, darunter gelbe Banden, im unteren Viertel der Platte beobachtet.

Die oberste Zone (Rf 0,88) wurde mit Äther eluiert, dem einige ml Ameisensäure zugesetzt worden waren. Die Ätherphase wurde über Na_2SO_4 getrocknet. Beim Abdampfen des Lösungsmittels kristallisierte die Verbindung spontan. Nach Sublimation im Ölpumpenvakuum wurde eine farblose kristalline Substanz vom Schmelzpunkt 158° erhalten. Eine Mischprobe mit authentischer Salicylsäure zeigte keine Schmelzpunktserniedrigung. Beide Substanzen waren nach UV- und IR-Analyse identisch. Der Metabolit ließ sich leicht acetylieren. Das Derivat schmolz nach Umkristallisation aus Wasser bei 135°. Authentisch dargestellte Acetoxysalicylsäure hatte einen Schmelzpunkt von 134°, die Mischprobe schmolz bei 133°. Nach UV-Spektrum und Rf-Werten (Fließmittelsystem III) sind beide Derivate identisch. Die Daten sind in Tab. 12 (s. S. 57) zusammengefaßt.

Die zweite Bande (Rf 0,73) wurde ebenfalls mit ameisensäurehaltigem Äther eluiert. Nach Abdampfen des Lösungsmittels kristallisierte der Metabolit ebenfalls spontan. Er war im Ölpumpenvakuum sublimierbar. In Methanol zeigte die isolierte Substanz nur eine Absorption bei 328 nm. Der Molekularpeak (M^+; 154 m/e) in der Massenspektroskopie stimmte mit dem für Gentisinsäure berechneten überein. Die authentische Carbonsäure zeigte im IR- und UV-Spektrum die gleichen Absorptionen wie der Metabolit. Beide Substanzen konnten leicht mit Methanol verestert werden (vgl. 2.14.2.). Beim Abdampfen des Lösungsmittels kristallisierten die Methylester aus. Nach Umkristallisation aus Cyclohexan schmolzen beide Produkte bei 87°. Entsprechende Übereinstimmung wurde beim Vergleich der UV- und IR-Spektren der Derivate gefunden. Gleiche Rf-Werte bei der DC sowie gleiche Reten-

tionszeiten bei der HPLC (Peak 4 in Abb. 8) erhärten diesen Befund. Die Daten sind in Tab. 13 (s. S. 58) zusammengefaßt.

Tab. 12 Identifizierung von Salicylsäure als Ausscheidungsprodukt beim Umsatz von Naphthalin-2-sulfonsäure durch Ruhezellen von Pseudomonas sp. A 1

Methode	isolierte Substanz	Salicylsäure (authentische Probe)
freie Substanz		
Retentionszeit bei HPLC (Min.) (Peak Nr. 6 in Abb. 8)	5,7	5,6
Rf-Wert bei DC Fließmittelsystem II	0,88	0,88
UV-Spektrum in Methanol (λ_{max}, nm)	303; 236	302; 235
IR-Spektrum in Nujol (cm^{-1})	3220; 1665	3220; 1665
Schmelzpunkt	158°	158°
Mischprobe	158°	
Acetylderivat		
Schmelzpunkt	135°	134°
Mischprobe	133°	
UV-Spektrum in Methanol (λ_{max}, nm)	275	275
Rf-Wert bei DC Fließmittelsystem III	0,61	0,60

Die Versuchsbedingungen bei HPLC- und DC-Analysen gehen aus 2.12.1. bzw. 2.12.2. hervor. Die Fließmittelsysteme sind in Tab. 16 und 17 im Anhang zusammengefaßt.

Tab. 13 Identifizierung von Gentisinsäure als Ausscheidungsprodukt beim Umsatz von Naphthalin-2-sulfonsäure durch Ruhezellen von Pseudomonas sp. A 1

Methode	isolierte Substanz	Gentisinsäure (authentische Probe)
freie Verbindung		
Retentionszeit bei HPLC (Min.) (Peak Nr. 4 in Abb. 8)	3,1	3,1
Rf-Wert bei DC Fließmittelsystem III	0,73	0,74
UV-Spektrum in Methanol (λ_{max}, nm)	328	328
IR-Spektrum in Nujol (cm^{-1})	3200 - 3400; 1665	3200 - 3400; 1665
Massenspektrum (M^+; m/e)	154	154 (ber.)
Schmelzpunkt	200° sub	200° sub
Mischprobe	200° sub	
Methylester		
Schmelzpunkt	86,5°	87°
Mischprobe	86°	
UV-Spektrum in Methanol (λ_{max}, nm)	338; 240	338; 240
Rf-Wert bei DC Fließmittelsystem IV	0,54	0,53

Die Versuchsbedingungen bei HPLC- und DC-Analysen gehen aus 2.12.1. bzw. 2.12.2. hervor. Die Fließmittelsysteme sind in Tab. 16 und 17 im Anhang zusammengefaßt.

Die langsam im unteren Drittel der Schicht wandernden Banden ließen sich selbst mit Methanol kaum eluieren. Beim bakteriellen Naphthalinabbau fanden DAVIES und EVANS (1964) als erstes Ringspaltungsprodukt cis-o-Hydroxybenzalpyruvat, das durch oxidative Decarboxylierung in Cumarin überführbar ist. Da nach den bisherigen Befunden beim Naphthalin-2-sulfonsäure-Abbau ein gleicher Metabolit zu erwarten war, wurde das untere Viertel

(einschließlich Startzone) der Kieselgel-Schicht von dem Träger gekratzt und in NaOH (0,1 N) suspendiert. Nach Zugabe von 30 %igem H_2O_2 wurde 1 Woche bei Raumtemperatur stehengelassen. Mit Hilfe der DC-Technik (Fließmittelsystem III) konnte dabei die Bildung einer neuen Verbindung verfolgt werden. Gegen Reaktionsende wurde der Ansatz mit 1 N HCl neutralisiert und ausgeäthert. Die organische Phase wurde durch präparative Chromatographie aufgetrennt. Die Bande mit Rf = 0,4 wurde mit Diäthyläther eluiert. Die beim Abdampfen des Lösungsmittels erhaltenen Kristall-Nadeln wurden aus Äther umkristallisiert und schmolzen dann bei 70°. Sie rochen charakteristisch nach Cumarin. Eine Mischprobe mit einer authentischen Verbindung zeigte keine Schmelzpunkterniedrigung. Nach UV-Spektrum sowie Rf-Werten in zwei Fließmittelsystemen (I und III) waren beide Verbindungen identisch. Eine Zusammenfassung der Daten ist in Tab. 14 gegeben.

Tab. 14 Identifizierung von Cumarin als Produkt der oxidativen Decarboxylierung von cis-o-Hydroxybenzalpyruvat, dem ersten Ringspaltungsprodukt beim Abbau von Naphthalin-2-sulfonsäure durch Ruhezellen von Pseudomonas sp. A 1

Methode	isolierte Substanz	Cumarin (authentische Probe)
Rf-Wert bei DC Fließmittelsystem-I	0,39	0,40
Rf-Wert bei DC Fließmittelsystem III	0,63	0,65
UV-Spektrum in Wasser (λ_{max}, nm)	277; 312 (s)	277; 312 (s)
Schmelzpunkt Mischprobe	70° 69°	69°

Die Fließmittelsysteme und die Rf-Werte sind in Tab. 16 im Anhang zusammengefaßt. Die Bedingungen der DC gehen aus 2.12.2. hervor.

Durch die Isolierung von Cumarin als oxidatives Decarboxylierungsprodukt war cis-o-Hydroxybenzalpyruvat als Metabolit wahrscheinlich. Cumarin konnte nur in äußerst geringen Mengen (~5 mg) gewonnen werden. Für die geringe Konzentration des eigentlichen Metaboliten während des Abbaus von NS-2 sprach ferner, daß er bei der HPLC nicht als Peak erfaßt wurde (Abb. 8).

Ein Ausscheidungsprodukt trat im Hochdruck-Flüssigkeitschromatogramm als Peak Nr. 3 (Abb. 8) in größeren Mengen in Erscheinung. Aufgrund der kurzen Retentionszeit mußte es sich um einen hochpolaren Metaboliten handeln. Die präparative Schichtchromatographie an Kieselgel kam deshalb für die Gewinnung des Produktes nicht in Frage. Bei der in situ Registrierung des Absorptionsspektrums mit Hilfe des Variscan-Detektors der HPLC zeigte die Verbindung in 0,01 M Phosphorsäure nur ein Maximum bei 317 nm. Derselbe Metabolit wurde bei entsprechender Inkubation von ruhenden Zellen mit Salicylsäure gefunden, jedoch nicht, wenn Gentisinsäure anstelle von NS-2 als Substrat eingesetzt wurde. Für das Ringspaltungsprodukt der Metapyrokatechase (Catechol 2,3-Dioxygenase) beim Umsatz von Brenzkatechin fanden DAGLEY und STOPHER (1959), DAGLEY et al. (1960) und KOJIMA et al. (1961) bei pH 7,0 eine UV-Absorption bei 375 nm. Im sauren Milieu wurde eine hypsochrome Verschiebung nach 320 nm beschrieben, was mit dem in situ gemessenen Absorptionsmaximum des Peaks Nr. 3 (Abb. 8) korreliert.

Zur weiteren Identifizierung des Metaboliten sollte manometrisch die Sauerstoffaufnahme beim Umsatz von Brenzkatechin durch zellfreie Extrakte bestimmt und das Reaktionsprodukt derivatisiert werden. Es wurde frisch bereiteter, hitzebehandelter Extrakt (vgl. 2.10.2.) von Pseudomonas sp. A 1 mit 4 µmole Brenzkatechin in einem Warburggefäß inkubiert. Nach Aufnahme von 1 µmol O_2 pro µmol Substrat war die Reaktion beendet. Im Ansatz wurden photometrisch 4 µmole des Ringspaltungsproduktes gefunden, wenn man den molaren Extinktionskoeffizienten von α-Hydroxymuconsäuresemialdehyd bei 375 nm zugrunde legte. CAIN und FARR (1968) beschrieben die Kondensation des Ringspaltungspro-

duktes der Metapyrokatechase mit NH_4Cl unter Säurekatalyse zu α-Picolinsäure. Analog wurde der Reaktionsansatz des Warburgversuches mit NH_4Cl versetzt und mit einem Tropfen konz. HCl angesäuert. Nach Abtrennen der ausgefallenen Proteine wurden nach mehreren Tagen photometrisch die Bildung eines neuen Produktes (λ_{max} = 266 nm) festgestellt. Unter gleichen pH-Bedingungen lieferte α-Picolinsäure ein ebensolches Spektrum.

Das zweite neu isolierte Bakterium Pseudomonas testosteroni A 3 zeigte bei analogen Versuchen nur geringe Tendenz, Metabolite in die Kulturflüssigkeit zu entlassen. Dabei konnte nach den gleichen Methoden wie für Stamm A 1 beschrieben nur Salicyl- und Gensitisinsäure einwandfrei als Metabolite identifiziert werden. Letztere muß ein Produkt des Salicylsäureabbaus sein, da sie in Kulturflüssigkeiten nachweisbar war, die Zellsuspensionen von Pseudomonas testosteroni A 3 und Salicylsäure enthielten. Dieser Weg wurde in der Literatur bislang nur von YANO und ARIMA (1958) erwähnt, aber auch dort nicht näher untersucht. Bekannter ist der Abbau der Salicylsäure via Brenzkatechin (FERNLEY und EVANS, 1958; DAVIES und EVANS, 1964; YAMAMOTO et al., 1965; KATAGIRI und MAENO, 1965). Das Nebeneinander zweier „Salicylsäurehydroxylasen" und Ringspaltungsenzyme sollte im folgenden näher untersucht werden.

3.3.3. Enzymatische Untersuchungen zur Metapyrokatechase- und Gentisinsäureoxygenase-Aktivität in Naphthalin-2-sulfonsäure-verwertenden Bakterien

Die Salicylsäurehydroxylase, die das Substrat unter Decarboxylierung zu Brenzkatechin umsetzt, ist ein gut untersuchtes, stabiles Enzym, das von YAMAMOTO et al. (1965) kristallin aus einem nicht näher spezifizierten Pseudomonas erhalten wurde. Mit dem von den Autoren beschriebenen Enzymtest (vgl. 2.10.1.) konnte in zellfreien Extrakten beider neu isolierten Bakterienstämme keine Aktivität der Salicylsäurehydroxylase nachgewiesen werden.

Durch Vergleich der Aktivitäten der beiden Ringspaltungsenzyme Metapyrokatechase und Gentisinsäureoxygenase sollte entschieden werden, welcher der beiden Abbauwege der Salicylsäure - via Brenzkatechin oder Gentisinsäure - der wichtigere ist. Die Enzymaktivitäten sind in Tab. 15 zusammengefaßt.

Tab. 15 Aktivitäten verschiedener Enzyme in zellfreien Extrakten von Pseudomonas sp. A 1 und Pseudomonas testosteroni A 3

Enzym	spez. Aktivität (nmole/min · mg Protein)	
	A 1	A 3
Salicylsäurehydroxylase	n. m.	n. m.
Metapyrokatechase	490	49
Pyrokatechase	n. m.	n. m.
Gentisinsäureoxygenase	4 010	16 300

Die Zellen wurden auf Naphthalin-2-sulfonsäure als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle angezogen, in der exponentiellen Wachstumsphase abzentrifugiert und, wie unter 2.8. beschrieben, weiter aufgearbeitet. Der resultierende zellfreie Extrakt wurde direkt zu Enzymmessungen (vgl. 2.10.1.) herangezogen. Nicht meßbare Aktivitäten sind in der Tab. durch n. m. ausgedrückt. Die Werte sind gemittelt aus zwei Versuchen, die unabhängig voneinader durchgeführt wurden.

Aus Tab. 15 geht hervor, daß in Pseudomonas sp. A 1 die Gentisinsäureoxygenase in 8fach höherer Aktivität vorlag als die Metapyrokatechase; in P. testosteroni A 3 war diese gar 320fach höher. Der Brenzkatechinweg war in letzterem Organismus für den Abbau der Salicylsäure nur weniger bedeutend. Eine Aktivität der Pyrokatechase (Catechol 1,2-Dioxygenase) war in beiden Bakterienstämmen nicht nachweisbar.

Damit war der Abbauweg der Naphthalin-2-sulfonsäure durch Pseu-

domonas sp. A 1 weitgehend aufgeklärt. Die Befunde sollten durch manometrische Messungen der Sauerstoffaufnahmeraten beim Umsatz der isolierten Metabolite durch ruhende Zellen untermauert werden. Besonders bei P. testosteroni A 3, wo weniger Metabolite isolierbar waren, sollten diese Versuche Auskunft darüber erteilen, ob das Bakterium den gleichen Abbauweg wie Pseudomonas sp. A 1 beschreitet.

3.3.4. Bestimmung von Sauerstoffaufnahmeraten beim Umsatz von Metaboliten des Naphthalin-2-sulfonsäure-Abbaus

Mit der Warburgtechnik sollte entschieden werden, ob die unter 3.3.2. beschriebenen Verbindungen wirkliche Metabolite waren. Mit Naphthalin-2-sulfonsäure (NS-2) angezogene oder induzierte Zellen sollten diese ohne lag-Phase umsetzen, vorausgesetzt, daß sie von der Zelle aufgenommen wurden. Es wurden, wie unter 2.10.2. beschrieben, auf NS-2 angezogene Zellen ohne Stickstoffquelle in der Warburgapparatur inkubiert. Die als Substrate eingesetzten Metabolite waren zum Teil sehr schwer wasserlöslich, weshalb als Lösungsvermittler Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt wurde. In Vorversuchen wurde der Einfluß des Lösungsmittels auf die Aktivität der Zellen untersucht. Das Ergebnis ist anhand des Naphthalinabbaus durch P. testosteroni A 3 in Abb. 9 (s. S. 64) dargestellt.

Die Abbildung zeigt deutlich, daß der Naphthalinumsatz in Gegenwart von 5 % DMSO optimal ist. Ein analoger Versuch mit Pseudomonas sp. A 1 und der gut löslichen NS-2 als Substrat zeigte keinen Unterschied zwischen Reaktionsansätzen, die 1 %, 5 % und kein DMSO enthielten. Da ein Zusatz von DMSO die Aktivität der Zellen bis zu einer Konzentration von 5 % nicht schädigte, wurde es generell den manometrischen Versuchsansätzen zugesetzt (vgl. 2.10.2.).

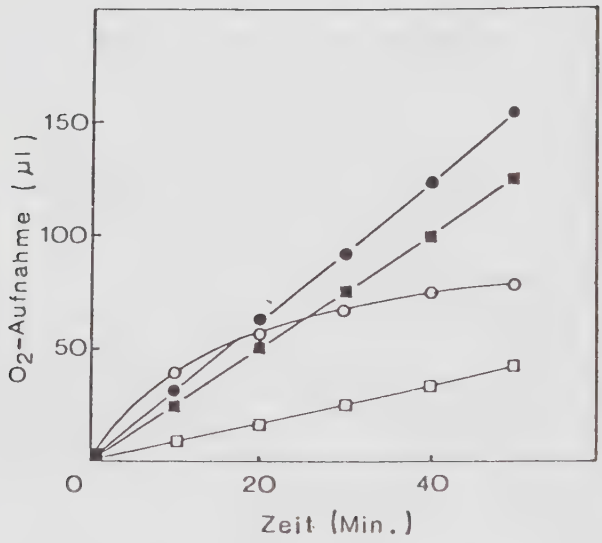


Abb. 9 Manometrische Bestimmung des Einflusses von Dimethylsulfoxid als Lösungsvermittler auf den Abbau von Naphthalin durch Ruhezellen von Pseudomonas testosteroni A 3

Auf Naphthalin angezogene, in der logarithmischen Wachstumsphase geerntete Zellen wurden, wie unter 2.10.2. beschrieben, mit Naphthalin inkubiert. Die Reaktionsansätze hatten eine Zelldichte von OD_{546} = 0,9 und enthielten steigende Mengen an DMSO und zwar 1 % (■), 5 % (●), 10 % (○) und 15 % (□). Die Sauerstoffaufnahmeraten sind um die Werte für die endogene Atmung korrigiert.

Die Sauerstoffaufnahmeraten beim Umsatz der als Substrate eingesetzten Metabolite durch Ruhezellen von Pseudomonas sp. A 1 sind in Abb. 10 graphisch dargestellt.

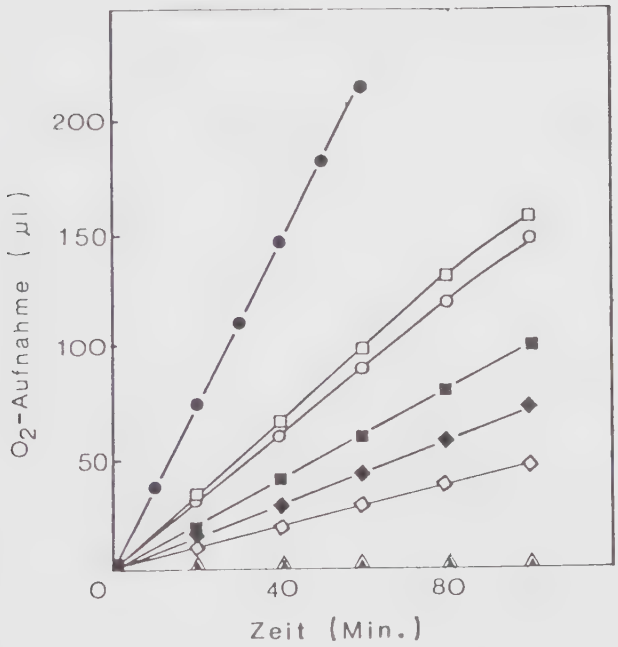


Abb. 10 Manometrische Bestimmung der Sauerstoffaufnahmeraten bei der Oxidation verschiedener Substrate durch Ruhezellen von Pseudomonas sp. A 1

Die auf Naphthalin-2-sulfonsäure angezogenen Zellen wurden, wie unter 2.10.2. beschrieben, mit verschiedenen Substraten (jeweils 2 µmole) inkubiert. Die Reaktionsansätze (2,2 ml) hatten eine optische Dichte von OD_{546} = 1,3 und enthielten Naphthalin-2-sulfonsäure (●), Cumarin (◆), Salicylaldehyd (□), Salicylsäure (○), Gentisinsäure (■), Brenzkatechin (◇), Naphthalin (△) und 2-Hydroxynaphthalin (▲). Die Sauerstoffaufnahmeraten sind um die Werte für die endogene Atmung korrigiert.

In einem analogen Experiment wurden Zellen von P. testosteroni A 3 untersucht. Die Sauerstoffaufnahmeraten sind in Abb. 11 wiedergegeben.

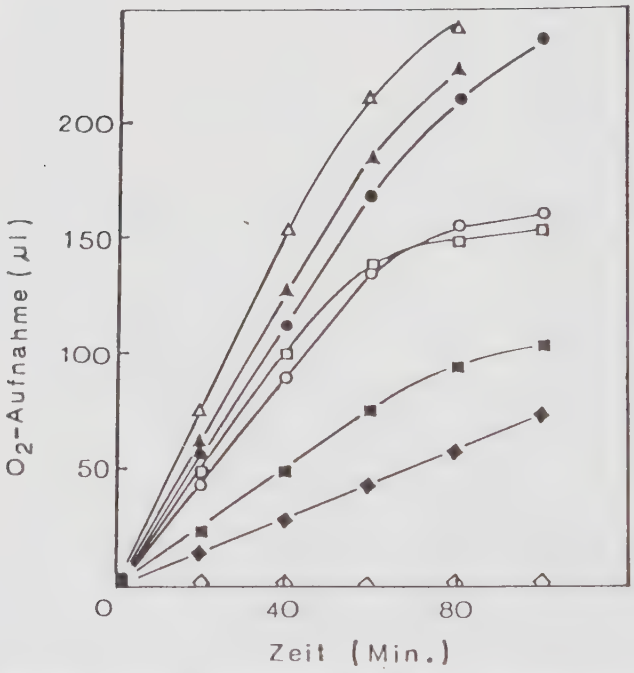


Abb. 11 Manometrische Bestimmung der Sauerstoffaufnahmeraten bei der Oxidation verschiedener Substrate durch Ruhezellen von Pseudomonas testosteroni A 3

Die auf Naphthalin-2-sulfonsäure angezogenen Zellen wurden, wie unter 2,10.2. beschrieben, mit verschiedenen Substraten (jeweils 2 µmole) inkubiert. Die Reaktionsansätze (2,2 ml) hatten eine Zelldichte von OD_{546} = 0,8 und enthielten Naphthalin-2-sulfonsäure (●), Naphthalin (△), 2-Hydroxynaphthalin (▲), Cumarin (◆), Salicylaldehyd (□), Salicylsäure (○), Gentisinsäure (■) und Brenzkatechin (◇). Die Sauerstoffaufnahmeraten sind um die Werte für die endogene Atmung korrigiert.

Mit Brenzkatechin als Substrat konnte keine O_2-Aufnahme gemessen werden.

3.3.5. Zusammenfassung der Untersuchungen zum Abbauweg der Naphthalin-2-sulfonsäure

Bei Ausscheidungsversuchen mit Pseudomonas sp. A 1 konnten 2-Hydroxynaphthalin, Cumarin, Salicylaldehyd, Salicylsäure, Gentisinsäure und Brenzkatechin aus der Kulturflüssigkeit isoliert werden, wenn ruhende Zellen mit Naphthalin-2-sulfonsäure inkubiert wurden. Die isolierten Metabolite wurden bis auf 2-Hydroxynaphthalin von Pseudomonas sp. A 1 veratmet. An zellfreien Extrakten konnte gezeigt werden, daß der Organismus Salicylsäure über Brenzkatechin und Gentisinsäure abbaut. Als Produkt der Metapyrokatechase-Aktivität wurde dabei α-Hydroxymuconsäuresemialdehyd gebildet. Das Ringspaltungsprodukt der Gentisinsäure wurde nicht weiter untersucht.

Für Pseudomonas testosteroni A 3 konnten durch Ausscheidungsversuche nur Gentisin- und Salicylsäure identifiziert werden. Messungen an zellfreien Extrakten zeigten, daß der Organismus Salicylsäure vollständig über den Gentisinsäureweg abbaut. Die Oxidation von Cumarin und Salicylaldehyd durch Ruhezellen machen auch für dieses Bakterium den für Stamm A 1 angegebenen Abbauweg der Naphthalin-2-sulfonsäure wahrscheinlich.

Da bei Pseudomonas testosteroni A 3 eine Sauerstoffaufnahme sowohl für Naphthalin als auch für 2-Hydroxynaphthalin, welche nicht gleichzeitig als Metabolite auftreten sollten (vgl. 3.2.), gemessen wurde, war das den Abbau einleitende, desulfonierende Enzymsystem im folgenden näher zu untersuchen.

3.4. Untersuchungen zur Heterolyse der Kohlenstoff-Schwefel-Bindung

Frühere Untersuchungen zum Abbau aromatischer Sulfonsäuren, in denen der Schwefel isotopenmarkiert war, zeigten, daß der Ringöffnung die Eliminierung der SO_3H-Gruppe vorangehen muß (FOCHT und WILLIAMS, 1970). Außer Sulfat konnten keine ^{35}S-markierten Zwischenprodukte gefaßt werden. In anderen Untersuchungen wurde

Sulfit als primäres Spaltprodukt in der Kulturflüssigkeit nachgewiesen (CAIN und FARR, 1968). Offenbar müssen prinzipiell die oben bereits erwähnten zwei Möglichkeiten der Heterolyse der Kohlenstoff-Schwefel-Bindung existieren (vgl. 3.1.2.). Dabei entstehen als Reaktionsprodukte entweder 2-Hydroxynaphthalin und Sulfit oder Naphthalin und Sulfat. Welcher der beiden Wege der Desulfonierung von den neu isolierten Bakterienstämmen beschritten wird, sollte im folgenden näher untersucht werden.

3.4.1. Versuche zur Desulfonierung bei Pseudomonas sp. A 1

Bei Umsatz von Naphthalin-2-sulfonsäure durch ruhende Zellen von Pseudomonas sp. A 1 wurde eindeutig 2-Hydroxynaphthalin als Metabolit identifiziert (vgl. 3.3.2.1.). Das zweite Spaltprodukt der Desulfonierung müßte Sulfit sein. Dieses Anion konnte jedoch weder in wachsenden Kulturen noch mit ruhenden Zellen gefaßt werden. Zur Kontrolle wurden gegen Ende des NS-2-Umsatzes definierte Mengen an Na_2SO_3 in den Reaktionsansatz gegeben. Mit der sehr empfindlichen Methode von PACHMAYR (1960) konnte das eingesetzte Sulfit wiedergefunden werden. Anstelle von Sulfit wurde beim Umsatz von NS-2 durch Pseudomonas sp. A 1 stets Sulfat akkumuliert (vgl. 3.3.1.).

3.4.2. Experimente zur oxygenolytischen Sulfonsäure-Eliminierung bei Pseudomonas testosteroni A 3

Das Bakterium kann sowohl Naphthalin als auch Naphthalin-2-sulfonsäure als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten. Es schien also zunächst, als würde der Alternativweg der SO_3H-Eliminierung unter Bildung von Aren und Sulfat beschritten. Es wurden hingegen manometrisch hohe Sauerstoffaufnahmeraten auch für 2-Hydroxynaphthalin gefunden (vgl. Abb. 11, s. S. 66). Aufgrund dieses Widerspruches sollte zunächst durch ein weiteres manometrisches Experiment die Induzierbarkeit des den NS-2-Abbau einleitenden Enzyms untersucht werden.

3.4.2.1. Manometrische Messungen zur Induktion des ersten Abbauenzymes

Zu verschieden induzierten Zellen von P. testosteroni A 3 wurde NS-2 gegeben und die Sauerstoffaufnahme verfolgt. Die eingesetzten Induktoren sind der Legende zu Abb. 12 zu entnehmen.

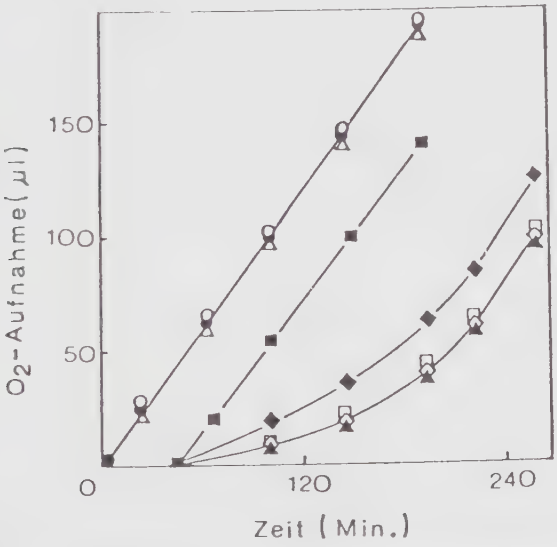


Abb. 12 Manometrische Bestimmung der Sauerstoffaufnahmeraten von verschiedenartig induzierten Zellen von Pseudomonas testosteroni A 3 bei der Oxidation von Naphthalin-2-sulfonsäure

Als Induktoren wurden eingesetzt: Salicylsäure (○), Naphthalin (△), 2-Hydroxynaphthalin (▲), Naphthalin-2-sulfonsäure (●), Gentisinsäure (■), Naphthalin-1-sulfonsäure (◆), Naphthalin-2-carbonsäure (◇) und Succinat (□). Die Reaktionsansätze (2,2 ml) enthielten jeweils 2 µmole NS-2. Die Sauerstoffaufnahmeraten sind um die Werte für die endogene Atmung korrigiert. Die Trübung der Zellsuspensionen war OD_{546} = 0,6.

Das überraschende Ergebnis dieses Versuches war, daß sowohl Naphthalin als auch Salicylsäure das den Abbau der NS-2 einleitende Enzym voll induzieren können. Strukturanaloge, wie 2-Hydroxynaphthalin und Naphthalin-2-carbonsäure oder die isomere Naphthalin-1-sulfonsäure, waren hierzu nicht in der Lage. Die Zellen hatten außerdem hohe Aktivität für die Oxidation von Naphthalin und 2-Hydroxynaphthalin, wie analoge manometrische Messungen zeigten. Das durch NS-2, Naphthalin und Salicylsäure induzierte Enzym konnte offenbar sowohl NS-2 als auch 2-Hydroxynaphthalin und Naphthalin umsetzen. Auf Succinat angezogene Zellen waren nicht in der Lage, die Sulfonsäure zu oxidieren, was das Vorhandensein eines konstitutiven Enzyms ausschloß. Inhibitionskinetiken sollten über die Natur dieses Enzyms weitere Auskünfte geben.

3.4.2.2. Versuche zur Hemmbarkeit des Naphthalin-2-sulfonsäure-Umsatzes

Da in Rohextrakten keine Aktivität für den Umsatz von NS-2 gefunden wurde, eine Anreicherung des dafür verantwortlichen Enzyms also nicht möglich war, mußten die weiteren Messungen mit ganzen Zellen durchgeführt werden. Es wurden auf NS-2 angezogene Zellen jeweils mit dem Substrat und dem Hemmstoff inkubiert. Den Umsatz von NS-2 in Gegenwart von 2-Hydroxynaphthalin zeigt Abb. 13. Die Graphik verdeutlicht, daß der Umsatz der Sulfonsäure in Gegenwart von 2-Hydroxynaphthalin gehemmt wurde. Zur Kontrolle wurde ein hemmstoff-freier Abbau in einem Parallelansatz verfolgt.

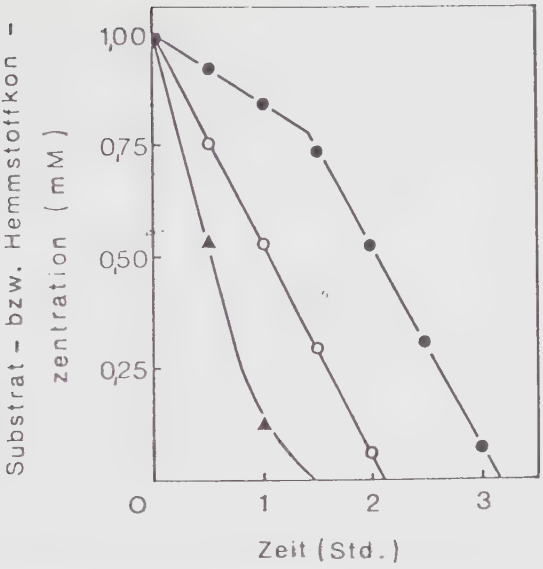


Abb. 13 Umsatz von Naphthalin-2-sulfonsäure allein und in Gegenwart von 2-Hydroxynaphthalin durch Ruhezellen von Pseudomonas testosteroni A 3

Auf NS-2 angezogene Zellen wurden in 50 ml Phosphatpuffer (80 mM; pH 7,4) bei 30° auf dem Rundschüttler mit NS-2 und 2-Hydroxynaphthalin (jeweils 1 mM) im gleichen Reaktionsansatz inkubiert. In Abständen von 30 Min. wurden Proben entnommen und jeweils 5 µl des Kulturüberstandes mittels HPLC analysiert. Der Umsatz der Sulfonsäure wurde in einem hemmstoff-freien Parallelansatz (○) und in Gegenwart von 2-Hydroxynaphthalin (●) verfolgt, dessen Abnahme im gleichen Ansatz bestimmt wurde (▲). Die Trübung betrug jeweils OD_{546} = 0,66.

Naphthalin hemmte den Umsatz der NS-2 sogar völlig. Erst nachdem ersteres verbraucht war, trat die volle Aktivität für den Abbau von Sulfonsäure hervor (Abb. 14).

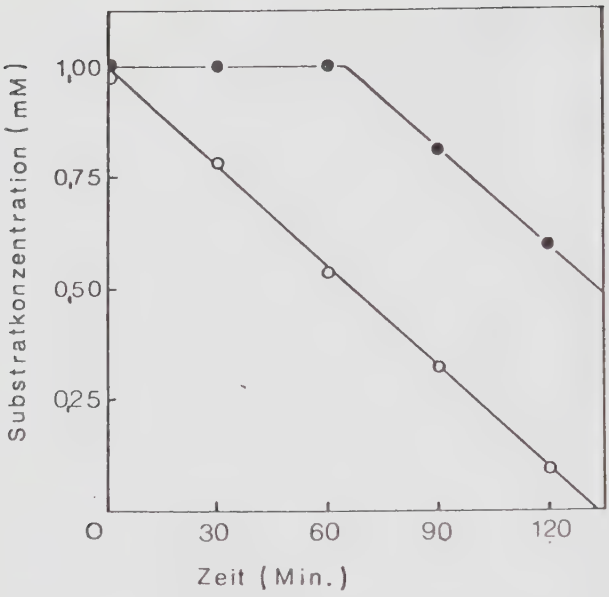


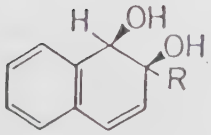
Abb. 14 Umsatz von Naphthalin-2-sulfonsäure allein und in Gegenwart von Naphthalin durch ruhende Zellen von Pseudomonas testosteroni A 3

Die Versuchsbedingungen sind unter Abb. 13 angegeben. Zusätzlich wurden die Kolben mit Gummikappen verschlossen, um Verluste des flüchtigen Naphthalins zu vermeiden. Die Probenentnahme erfolgte durch eine Kanüle mit Absperrhahn. Die Trübung der beiden Reaktionsansätze betrug OD_{546} = 0,6. Dargestellt ist der Umsatz der Naphthalin-2-sulfonsäure (1 mM) allein (○) und in Gegenwart von Naphthalin (●).

Der Umsatz des Hemmstoffes Naphthalin konnte in diesem Fall nicht ermittelt werden, weil es wegen seiner geringen Polarität und langen Retentionszeit mittels HPLC an einer C-H-Säule nicht analysierbar war. Ein Vergleich mit Abb. 13 zeigt, daß Naphthalin größere Affinität zum Enzym aufwies als 2-Hydroxynaphthalin oder gar die Sulfonsäure. Ersteres schien somit das natürliche Substrat zu sein.

Erst kürzlich berichteten BARNSLEY (1975) und SHAMSUZZAMAN und BARNSLEY (1974a, 1974b) über die Induktion der Naphthalinoxygenase durch Salicylsäure. Da das hier untersuchte Enzym ebenfalls durch diese Verbindung induzierbar war (vgl. Abb. 12), wird es im folgenden zunächst als Naphthalinoxygenase bezeichnet.

Naphthalin wird entweder durch eine Monooxygenase und Epoxidhydrase oder durch eine Dioxygenase in 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin umgewandelt (JERINA et al., 1971). Dabei führt der Angriff einer Monooxygenase zum trans-Dihydrodiol, die Dioxygenierung jedoch zum cis-Isomeren. Aus der Stereochemie solcher Zwischenprodukte ist also eine Entscheidung über die Art der Oxygenase möglich. Im vorliegenden Fall konnte weder beim Umsatz von Naphthalin-2-sulfonsäure noch von 2-Hydroxynaphthalin das Auftreten eines Dihydrodiols in der Kulturflüssigkeit beobachtet werden. Bei der Oxidation von Naphthalin hingegen war mittels HPLC kurzzeitig ein Zwischenprodukt analysierbar, das bei der in situ Registrierung (vgl. 2.12.1.) ein Absorptionsmaximum bei 263 nm zeigte. Eine Isolierung war jedoch unmöglich, da es zu schnell weiter umgesetzt wurde. Da beim Umsatz von NS-2 und 2-Hydroxynaphthalin in keiner Phase ein solches Zwischenprodukt auftrat, wurde zunächst hypothetisch angenommen, daß der Angriff der Oxygenase unter Einfluß des Substituenten stets in der 1,2-Stellung erfolgt. Diese Oxidation sollte zu einem Dihydrodiol führen, das am Kohlenstoffatom in 2-Stellung zusätzlich zum Hydroxylsubstituenten eine SO_3H- bzw. eine weitere Hydroxyl-Gruppe tragen würde. Im Falle von R = H (Naphthalin) kommt es zur kurzzeitigen Akkumulation des 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalins. Bei R = SO_3H bzw. OH (NS-2 bzw. 2-Hydroxynaphthalin) würde jedoch H_2SO_3 bzw. HOH abgespalten werden, da es sich um das labile Bisulfitadditionsprodukt bzw. Hydrat einer cyclischen Carbonylverbindung handelt. Die Isolierung einer sol-



chen Verbindung scheint nicht möglich, da sich die entstehende Carbonylverbindung unter Rearomatisierung zum 1,2-Dihydroxynaphthalin stabilisieren würde. Bei Substituenten R, die nur schwer unter Mitnahme des Elektronenpaares eliminiert werden können, sollte die erwünschte Akkumulation des Dihydrodiols eintreten. Ein solcher Substituent ist die Carboxylgruppe, die im Regelfall nur unter Zurücklassung des Elektronenpaares als CO_2 austreten kann.

Durch einen weiteren Inhibitionsversuch sollte zunächst geklärt werden, ob die Carbonsäure durch die gleiche Dioxygenase gebunden wird, welche für den unspezifischen Umsatz von NS-2, 2-Hydroxynaphthalin und Naphthalin verantwortlich war. Es wurde der Umsatz der Carbonsäure allein und in Gegenwart von NS-2 verfolgt (Abb. 15, s. S. 75). Offensichtlich wurde auch Naphthalin-2-carbonsäure (NC-2) durch die Naphthalindioxygenase umgesetzt, da die Oxygenierung durch die Anwesenheit von NS-2 gehemmt wurde. Da der Umsatz der Carbonsäure im Vergleich zur Sulfonsäure relativ langsam verlief, mußte bei hohen Zellkonzentrationen gemessen werden, wodurch der rasche Abfall der NS-2-Konzentration schwer zu verfolgen war.

Gleichzeitig mit dem Umsatz der NC-2 entstand streng proportional ein Reaktionsprodukt, welches sich bei der HPLC-Analyse durch einen intensiven Peak (mit 1/4 der Retentionszeit der NC-2) zu erkennen gab. Da es sich bei diesem Metaboliten offensichtlich um das geforderte Dihydrodiol handelte, sollte dessen Isolierung und Charakterisierung erfolgen. Von der relativen Konfiguration der OH-Gruppen dieser Verbindung war ein wertvoller Hinweis auf den Oxygenierungsmechanismus zu erwarten.

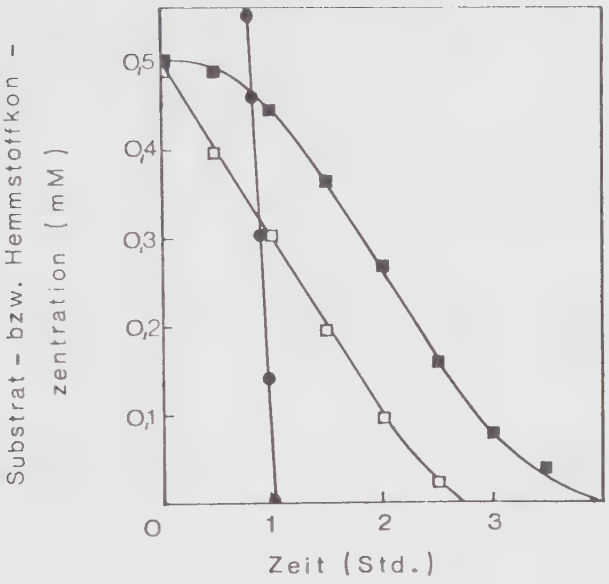


Abb. 15 Hemmung der Cooxidation von Naphthalin-2-carbonsäure durch Naphthalin-2-sulfonsäure in ruhenden Zellen von Pseudomonas testosteroni A 3

Auf NS-2 angezogene Zellen wurden in 50 ml Phosphatpuffer (80 mM; pH 7,4) auf dem Rundschüttler bei 30° inkubiert. Die Zellkonzentration entsprach einer optischen Dichte von 2,7 (OD_{546}). In Abständen von anfänglich 15, später 30 Min., wurden Proben entnommen und jeweils 5 µl der Kulturflüssigkeit mittels HPLC analysiert. Dargestellt sind der Umsatz von Naphthalin-2-carbonsäure (0,5 mM) allein (□) sowie in Gegenwart von NS-2 (■), deren Abnahme im gleichen Reaktionsansatz verfolgt wurde (●).

3.4.2.3. Das Cooxidationsprodukt der Naphthalin-2-carbonsäure

In Vorversuchen wurde beobachtet, daß eine Zellsuspension gegebener Dichte nur eine limitierte Menge an NC-2 vollständig umsetzte. Zur Optimierung der Produktausscheidung wurde zunächst geprüft, ob konstitutiv verwertbare Substrate die Cooxidationsleistung der Zellen erhöhten (Abb. 16).

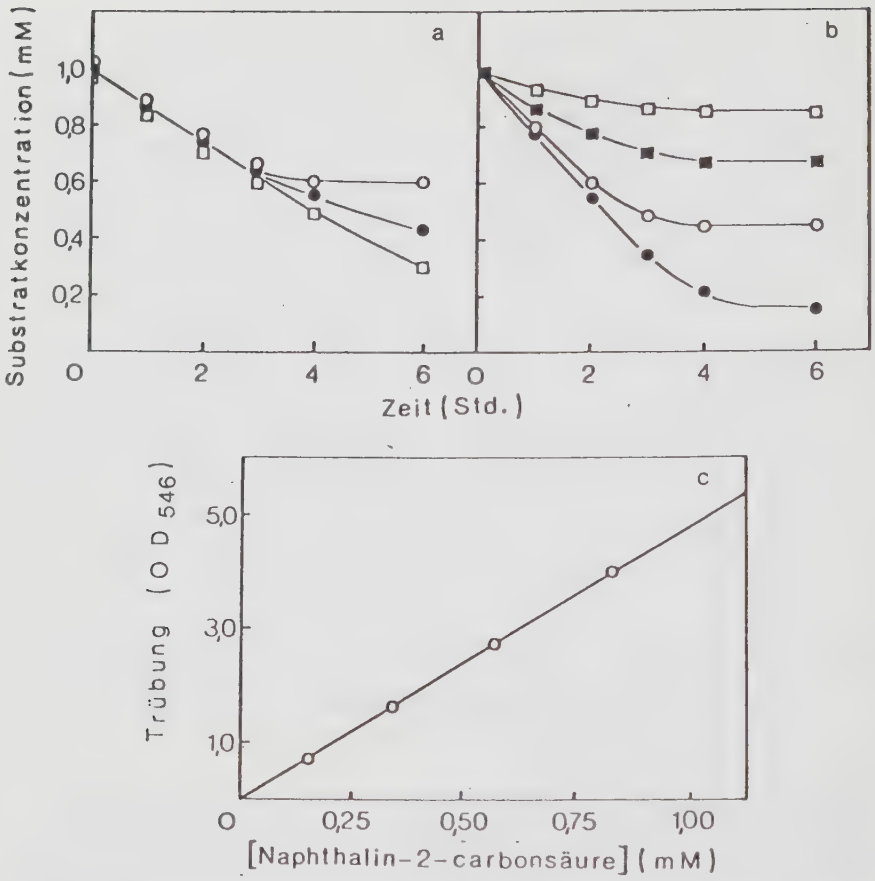


Abb. 16 Cooxidation von Naphthalin-2-carbonsäure durch ruhende Zellen von Pseudomonas testosteroni A 3

Die auf Naphthalin-2-sulfonsäure angezogenen Zellen von Pseudomonas testosteroni A 3 wurden in 50 ml Phosphatpuffer (80 mM; pH 7,4) mit NC-2 (1 mM) bei 30° auf dem Rundschüttler inkubiert. In Abständen von 1 Std. wurden Proben entnommen und jeweils 5 µl der zellfreien Kulturflüssigkeit mittels HPLC analysiert.

a. Einfluß von konstitutiv verwertbaren Substraten auf die Cooxidation der NC-2. Die Ansätze enthielten Succinat (10 mM) + NC-2 (1 mM) (□); Malat (10 mM) + NC-2 (1 mM) (●) und NC-2 (1mM) allein (○). Die OD_{546} betrug jeweils 2,0.

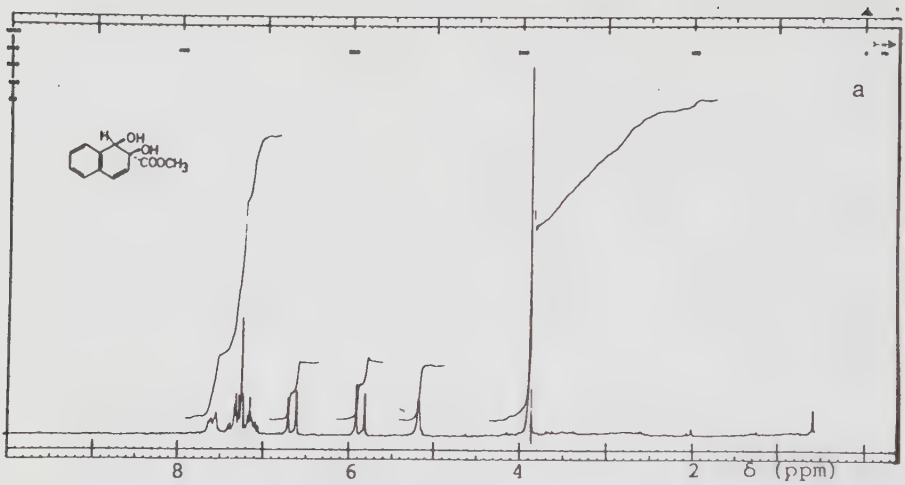
b. Umsatz von 1 mM Naphthalin-2-carbonsäure durch Zellen der optischen Dichten 4,0 (●); 2,7 (○); 1,6 (■) und 0,75 (□) (OD_{546}).

c. Auftragung der aus b ermittelten, durch eine bestimmte Zelldichte cooxidierbaren Mengen an NC-2.

Wie Abb. 16a zeigt, förderte Succinat den Umsatz von NC-2 demnach mehr als Malat. Die durch verschiedene Zellkonzentrationen maximal umsetzbaren Mengen an NC-2 sind in Abb. 16b dargestellt. Offensichtlich bestand eine strenge lineare Proportionalität zwischen der eingesetzten Zellmenge und der maximal cometabolisierten Menge an NC-2 (Abb. 16c). Dieser Befund kann als Arbeitsdiagramm bei der Herstellung größerer Mengen des Oxidationsproduktes der Naphthalin-2-carbonsäure dienen. Aus der Graphik ist ersichtlich, welche Zelldichte benötigt wird, um eine vorgegebene Konzentration an Carbonsäure vollständig in das Produkt umzuwandeln.

Zur Isolierung des Oxygenierungsproduktes der Naphthalin-2-carbonsäure wurden, wie unter 2.5.1. beschrieben, Zellen von *P. testosteroni* A 3 auf NS-2 angezogen. Nachdem die Zellkonzentration eine Trübung von OD_{546} = 3,0 erreicht hatte, wurde NC-2 als Substrat angeboten. Die Bildung des Oxygenierungsproduktes konnte mit Hilfe der HPLC verfolgt werden. Sobald NC-2 vollständig umgesetzt war, wurde nach Abtrennen der Zellen das Überstehende bis auf ca. 1/40 des ursprünglichen Volumens eingeengt. Nach Ansäuern auf pH 2,0 wurde die wäßrige Phase mit Essigsäureäthylester extrahiert. Es wurde schnell und bei 0^{o} gearbeitet, um die säurekatalysierte Rearomatisierung niedrig zu halten (REINEKE, 1973). Die eingeengte organische Phase wurde, wie unter 2.14.2. beschrieben, mit Diazomethan methyliert. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in heißem Benzin (Siedebereich 60^{o} - 80^{o}) aufgenommen. Beim Abkühlen kristallisierte der Methylester aus. Umkristallisation aus dem gleichen Lösungsmittel lieferte farblose Nadeln vom Schmelzpunkt 124^{o}. Die Ausbeute betrug lt. HPLC-Analyse praktisch 100 %, an isoliertem Produkt jedoch 81,4 %.

Das NMR-Spektrum des isolierten Methylesters des Oxygenierungsproduktes der Naphthalin-2-carbonsäure ist in Abb. 17 wiedergegeben.



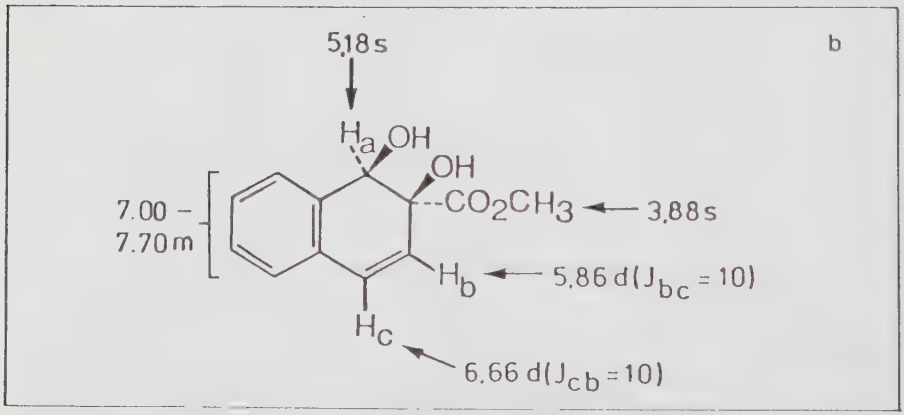
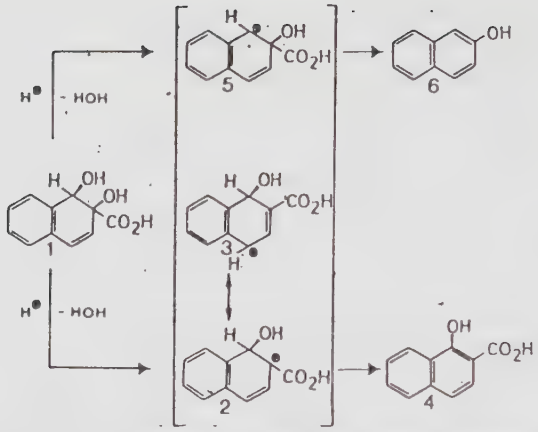


Abb. 17 NMR-Spektrum des 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäuremethylesters (a) und die Zuordnung der Signale (b)

Hinter dem Pfeil in Abb. 17b ist die chemische Verschiebung δ in ppm und die Art des Signals (s = Singulett, d = Dublett, m = Multiplett) mit der dazugehörigen Kopplungskonstanten J (in Klammern) angegeben. Die Indizes beziehen sich auf die jeweils untereinander koppelnden Protonen; die Aufspaltung ist in Hertz (Hz) ausgedrückt.

Aufgrund der Integrale und der chemischen Verschiebung δ kann das Multiplett im Bereich von 7,00 ppm bis 7,70 ppm den vier Protonen des unsubstituierten aromatischen Ringes und das Singulett bei 3,88 ppm den drei H-Atomen der Carboxymethylgruppe zugeordnet werden. Die beiden Hydroxylprotonen sind als sehr schwache und breite Banden bei ~2,7 ppm bzw. ~3,5 ppm sichtbar. Die drei verbleibenden Protonen des substituierten Ringes erscheinen als Dubletts bei 6,66 ppm und 5,86 ppm sowie als Singulett bei 5,18 ppm. Erstere spalten durch Kopplung untereinander auf (H_b und H_c), während H_a als isoliert stehendes Proton ein einziges Signal hervorruft. Dieses Singulett ist ein Hinweis, daß die Naphthalin-2-carbonsäure, wie angenommen, nur in 1- und 2-Stellung, also in Nachbarstellung zur Carboxylgruppe, oxygeniert wurde. Andernfalls müßte das Signal bei 5,18 ppm ebenfalls eine Kopplungsaufspaltung zeigen. Zur Erhärtung dieses Befundes sollte der isolierte Methylester durch säurekatalysierte Rearomatisierung in eine Hydroxynaphthalincarbonsäure überführt werden. Die Stellung der OH-Gruppe im Reaktionsprodukt sollte Rückschlüsse auf den Ort der Oxygenierung zulassen.

In Gegenwart von Mineralsäuren werden Cyclohexadien-1,2-diole leicht unter Wasserabspaltung zu Phenolen rearomatisiert (GIBSON et al., 1975). Monocyclische Verbindungen, wie die 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure, sind deshalb labil. Ihre Darstellung liefert selbst bei sehr schonender Extraktion stets Phenole und Salicylate als Nebenprodukte (REINER und HEGEMAN, 1971). Dieser Befund sollte im vorliegenden Fall zur Charakterisierung der 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure beitragen, da nur ein Reaktionsprodukt zu erwarten war (Schema 1).



Schema 1 Durch Säure katalysierte Rearomatisierung von 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure

Unter stark sauren Bedingungen kann jeweils eine der beiden OH-Gruppen der 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure (1) protoniert werden. Wasserabspaltung liefert die Carboniumionen 2 bzw. 5. Da jedoch 2 zusätzliche Mesomeriestabilisierung durch 3 erhält, sollte vorwiegend die Hydroxycarbonsäure (4) und nicht 2-Hydroxynaphthalin (6) entstehen. Analog fanden JERINA et al. (1971) bei der säurekatalysierten Rearomatisierung von 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin 1-Hydroxynaphthalin und weniger als 5 % des 2-Isomeren. Zur Versuchsdurchführung wurde die als Methylester isolierte 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure zunächst verseift. Der Methylester wurde in Äther gelöst und durch Zugabe einer äquimolaren Menge von Na-Methylat quantitativ in das Na-Salz überführt (CLAISEN, 1905). Der dabei ausgefallene Niederschlag wurde abgetrennt und anschließend in 2 N HCl gelöst. Im Verlaufe von ca. 12 Std. kristallisierte das schwerlösliche Reaktionsprodukt aus. Die Kristalle wurden abgesaugt und aus Wasser umkristallisiert. Die Ausbeute an Reinprodukt betrug 58 %. Die farblosen Nadeln schmolzen bei 181,5°. Die Mischprobe mit authentischer 1-Hydroxynaphthalin-2-carbonsäure ergab keine Schmelzpunktdepression. Aufgrund der UV- und IR-Daten waren die isolierte und die

synthetische Verbindung identisch.

Zur Charakterisierung wurde der 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäuremethylester mit spektroskopischen Methoden eingehender untersucht, da es sich um eine in der Literatur bislang nicht beschriebene neue Verbindung handelte.

Im ultravioletten Spektralbereich absorbierte der Methylester bei λ_{max} = 262 nm mit ε = 8450 (Abb. 18). Im gleichen Schaubild ist das CD-Spektrum der Verbindung dargestellt.

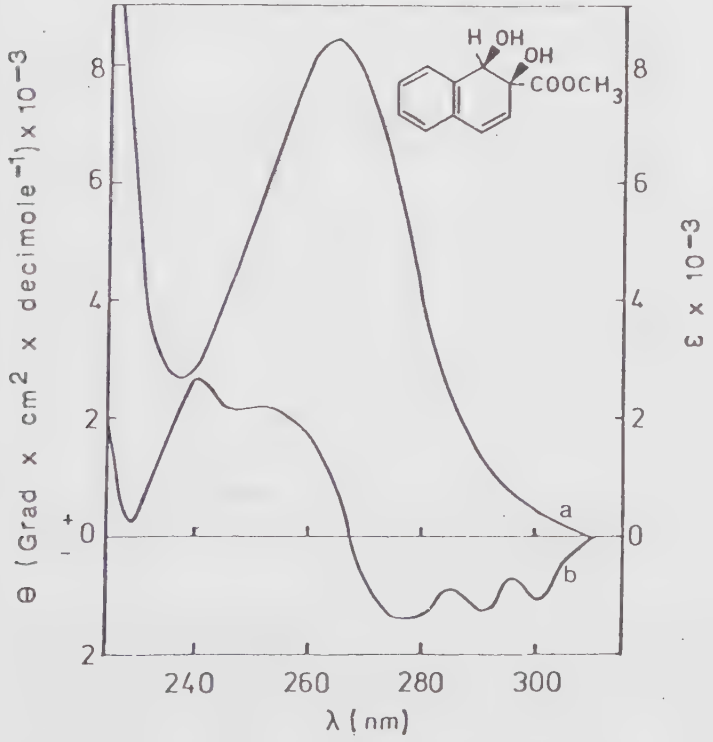


Abb. 18 UV-Spektrum (a) und Zirkulardichroismus (b; c = 2 mM) von 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäuremethylester in Methanol

Der isolierte 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäuremethylester zeigte bei der Massenspektroskopie die in Abb. 19 wiedergegebenen Bruchstücke. Aus dem hochaufgelösten Massenspektrum ergab sich ein Molekulargewicht von 220,0740, welches mit dem theoretischen Wert von 220,0736 (berechnet als $C_{12}H_{12}O_4$) gut übereinstimmte.

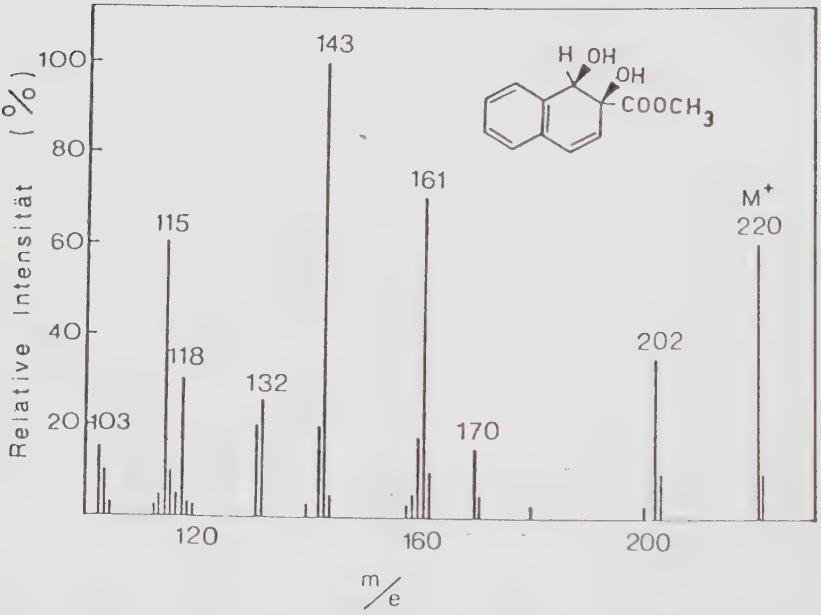
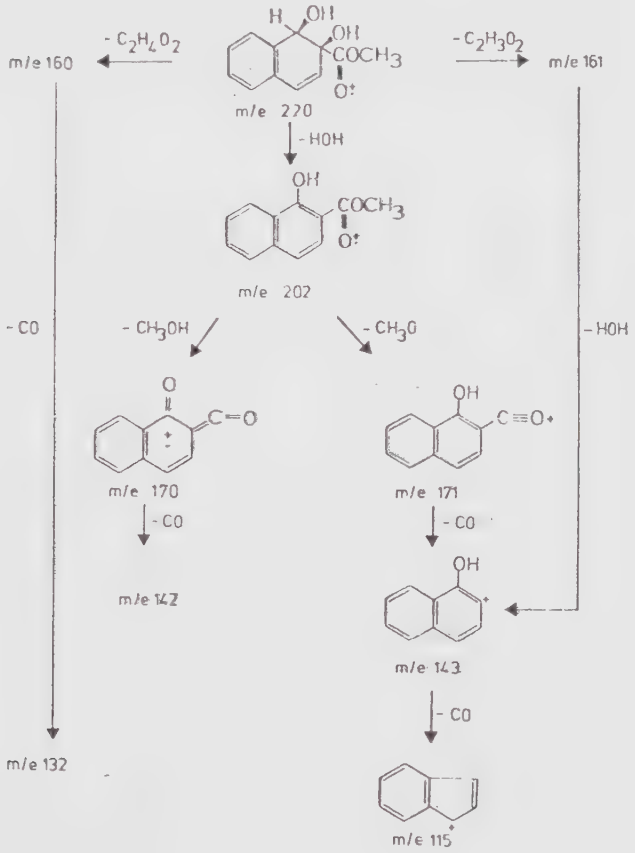


Abb. 19 Massenspektrum des 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäuremethylesters (Versuchsbedingungen s. 2.13.)

Die Verbindung verliert bei der Massenspektroskopie zunächst ein Molekül H_2O. Die Wasserabspaltung und Bildung eines phenolischen Aromaten hat sie mit anderen Dihydrodiolen gemein (GIBSON et al., 1968, 1970a, 1970b, 1973, 1975; JERINA et al., 1971; YOUNG et al., 1969a, 1969b). Beim weiteren Zerfall treten analoge Schlüsselionen auf, wie bei der Fragmentierung von verschiedensubstituierten 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-

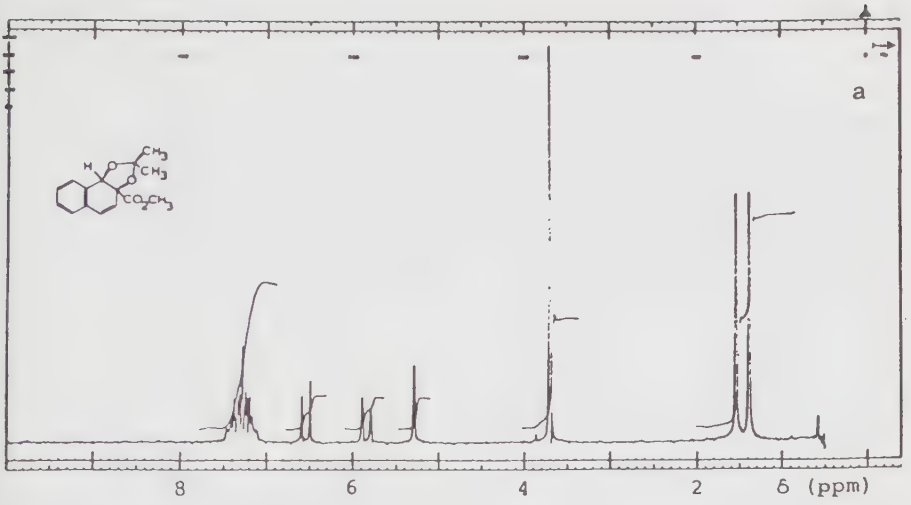
carbonsäuren (REINEKE, 1976). In Schema 2 sind Strukturvorschläge für die Bruchstücke zusammengefaßt.



Schema 2 Möglichkeiten der Fragmentierung bei der Massenspektroskopie des 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäuremethylesters

Die Stellung der Hydroxylgruppen in der 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure ist für die Deutung des Oxygenierungsmechanismus entscheidend. JEFFREY et al. (1975) konnten die OH-Gruppen des cis-1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalins durch Kondensation mit 2,2-Dimethoxypropan (FIESER und FIESER, 1967) verbrücken. Die Autoren berichteten, daß ein entsprechendes Acetonid aus dem trans-Diol nicht darstellbar war. Für die Dihydrodiole der Carbonsäure waren prinzipiell gleiche Reaktionen zu erwarten.

Unter den bei JEFFREY et al. (1975) angegebenen Bedingungen lieferte die 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure mit HCl als Katalysator glatt das entsprechende Acetonid. Der Umsatz ließ sich im Reaktionsansatz mit Hilfe der DC verfolgen und war nach 6 Std. beendet (gegenüber 1 Std. beim cis-1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin; vgl. JEFFREY et al., 1975). Nach Abdampfen des Lösungsmittels kristallisierte der zunächst ölige Rückstand, sobald Reste der HCl durch mehrmaliges Abdampfen mit Benzol entfernt worden waren. Das Rohprodukt war aus Hexan umkristallisierbar und schmolz bei 94^{o}. Die Ausbeute betrug 89 %. Im hochaufgelösten Massenspektrum wurde das Molekulargewicht von 260,1051 in guter Übereinstimmung mit dem theoretischen Wert von 260,1049 (berechnet als $C_{15}H_{16}O_4$) gefunden. Die spezifische Drehung $\alpha_D = +244^{o}$ wurde in 0,5 und 1 %iger methanolischer Lösung bei 25^{o} bestimmt. Im UV absorbierte das Acetonid bei einer Wellenlänge von 262 nm mit ε = 8800. Das NMR-Spektrum ist dem des 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäuremethylesters (vgl. Abb. 17) ähnlich und zeigt, wie erwartet, zwei zusätzliche Singuletts bei δ = 1,38 ppm und 1,54 ppm für zwei geminale Methylgruppen (Abb. 20).



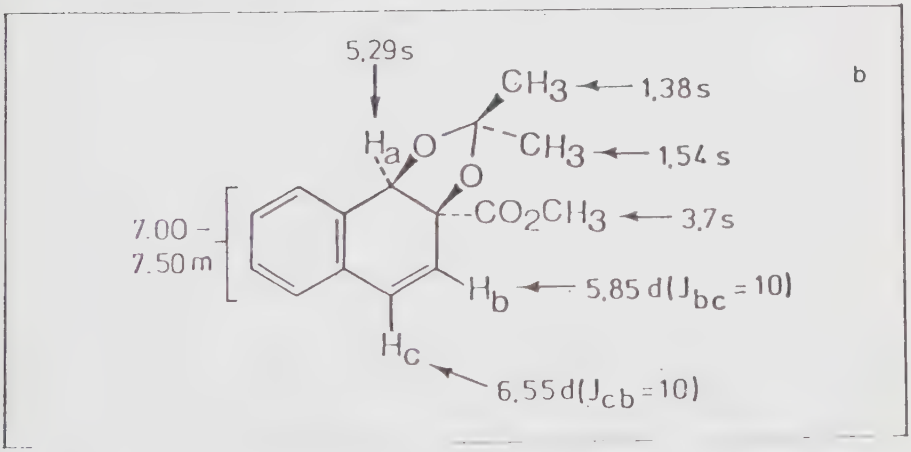


Abb. 20 NMR-Spektrum des Isopropylidenderivates des 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäuremethylesters (a) und die Zuordnung der Signale (b)

Hinter dem Pfeil in Abb. 20b ist die chemische Verschiebung δ in ppm und die Art des Signals (s = Singulett, d = Dublett, m = Multiplett) mit der dazugehörigen Kopplungskonstanten J (in Klammern) angegeben. Die Indizes beziehen sich auf die jeweils untereinander koppelnden Protonen; die Aufspaltung ist in Hertz (Hz) ausgedrückt.

Eine wichtige Methode zur Identifizierung und Charakterisierung von organischen Verbindungen stellt die Infrarotspektroskopie (IR) dar. Die typischen Absorptionen geben Auskunft über funktionelle Gruppen, Solvatation, Wasserstoffbrückenbindung usw. Eine Gegenüberstellung der IR-Spektren des Acetonids und der Ausgangsverbindung zeigt im Fall des Isopropylidenderivates das Fehlen der typischen OH-Absorptionsschwingungen bei 3480 cm^{-1} und 3520 cm^{-1}, weil beide Alkoholgruppen zum Vollacetal (d. h. 1,3-Dioxolanring) derivatisiert sind (Abb. 21 und 22).

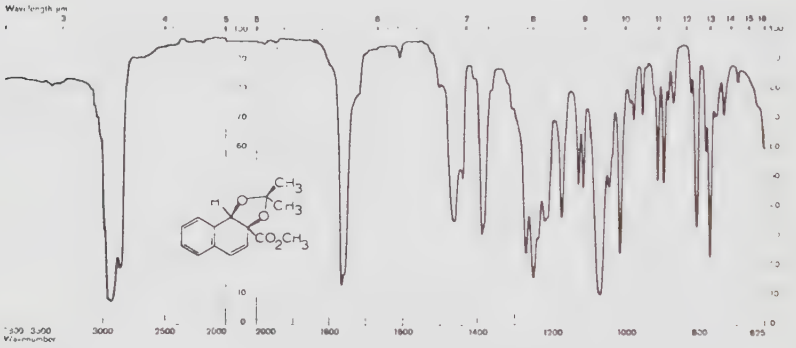


Abb. 21 Infrarotspektrum des Isopropylidenderivates des 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäuremethylesters in Nujol

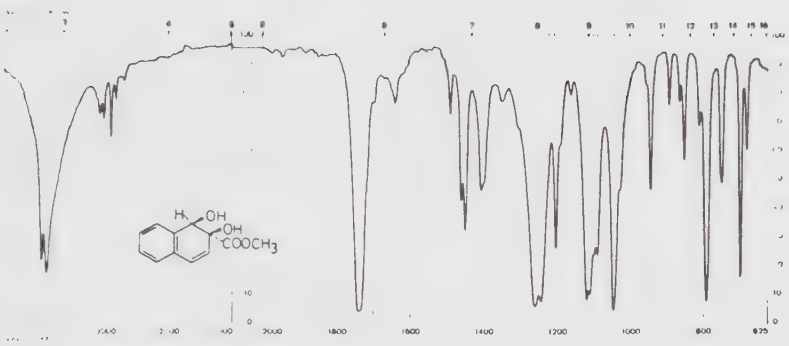


Abb. 22 Infrarotspektrum des 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäuremethylesters in KBr

Für Konformationsanalysen sind die beiden oben erwähnten OH-Absorptionsschwingungen im IR von Bedeutung (KUHN, 1952, 1954, 1958; COLE et al., 1959). Die Autoren fanden, daß ein vic-Glykol durch zwei Banden bei 3000 cm^{-1} ausgezeichnet ist. Die Bande mit der höheren Schwingungszahl entspricht der freien OH-Gruppe, während die andere von der intramolekular gebundenen OH-Gruppe hervorgerufen wird. Die Messung erfolgt dabei in CCl_4 in verdünnter Lösung, um intermolekulare Wasserstoffbrückenbildung zu vermeiden. Der Unterschied $\Delta\nu$ zwischen beiden Banden wird um so größer, je kürzer die OH-Gruppen über Wasserstoff verbrückt sind. In verdünnter CCl_4-Lösung wurde für 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäuremethylester die freie OH-Absorptionsschwingung bei 3580 cm^{-1} und die über Wasserstoff intramolekular gebundene bei 3520 cm^{-1} gefunden. Die Differenz $\Delta\nu$ = 60 cm^{-1} weist auf die cis-Konfiguration der Diol-Gruppen hin.

3.4.3. Zusammenfassung der Ergebnisse zur Desulfonierung von Naphthalin-2-sulfonsäure

Beim Umsatz von Naphthalin-2-sulfonsäure durch Pseudomonas sp. A 1 wurde 2-Hydroxynaphthalin als Metabolit isoliert und identifiziert. Dieses Spaltprodukt der Desulfonierung sollte zusammen mit Sulfit auftreten. In der Kulturflüssigkeit war dagegen nur Sulfat nachweisbar.

Pseudomonas testosteroni A 3 oxygenierte Naphthalin-2-sulfonsäure, Naphthalin und 2-Hydroxynaphthalin offenbar mit demselben Enzym. Das den Abbau der Aromaten einleitende Enzym war durch Naphthalin, Naphthalin-2-sulfonsäure und Salicylsäure induzierbar. Mit Hilfe von Inhibitionskinetiken an ganzen Zellen wurde dieses Enzym als Naphthalinoxygenase erkannt. Naphthalin-2-carbonsäure wurde quantitativ zu 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure cooxidiert. Das Oxygenierungsprodukt wurde isoliert und charakterisiert. Die Derivatisierbarkeit des 1,2-Diols zum Acetonid und das IR-Spektrum bestätigten die cis-Konfiguration der Hydroxylgruppen dieser Verbindung.

4. DISKUSSION

4.1. Katabolismus der Naphthalin-2-sulfonsäure

Die Sulfonsäuren stellen unter den Naturstoffen eine Rarität dar. Neben Taurin und Taurocholsäure (KARLSON, 1974) zählen Methylsulfonsäure (BERSIN, 1950) und Coenzym M (TAYLOR und WOLFE, 1974) zu den wenigen Ausnahmen. Natürliche aromatische Sulfonsäuren wurden bislang nicht beobachtet. Entsprechend selten ist bei Bakterien die Fähigkeit zur Spaltung der „unphysiologischen" aromatischen Kohlenstoff-Sulfonsäure-Bindung. Bei den bislang bekannten Beispielen erfolgt die Eliminierung eines persistenzverursachenden Substituenten als primäre katabolische Reaktion, die den Abbau des Aromaten einleitet (CAIN und FARR, 1966) und nicht wie bei den halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen, welche vorher in nichtaromatische Zwischenprodukte überführt werden müssen (KNACKMUSS, 1975).

Neben der Desulfonierung ist die Permeabilitätsbarriere der Zellmembran (ALEXANDER, 1973) als kritischer Schritt beim mikrobiellen Umsatz der hochpolaren aromatischen Sulfonsäuren anzusehen. Als Bestandteile von Detergentien sind die einfachsten Vertreter dieser Stoffklasse, die Alkylbenzolmonosulfonate, hinsichtlich ihres mikrobiellen Abbaus eingehend untersucht (SWISHER, 1970; GLEDHILL, 1974). Übereinstimmend wird berichtet, daß sie trotz Sulfonsäuregruppe gut umgesetzt werden, solange die Alkylseitenkette unverzweigt ist. Die Einführung einer zusätzlichen SO_3H-Gruppe in den aromatischen Ring verlangsamt den Abbau jedoch erheblich (ALEXANDER und LUSTIGMAN, 1966).

Sulfonierte Naphthaline gehören aus bislang nicht geklärten Gründen zu den biologisch schwer abbaubaren Umweltchemikalien. Untersuchungen zur Persistenz fehlten bislang völlig, weil keine empfindlichen analytischen Methoden zur Verfügung standen. In dieser Arbeit konnte durch Chromatographie unter hohem Druck (HPLC) eine befriedigende Trennung und Detektion der

einfachen Vertreter dieser hochpolaren Stoffklasse erreicht werden.

Anreicherungen von Naphthalinsulfonsäure-verwertenden Mikroorganismen zeigten, daß die Naphthalin-2-sulfonsäure (NS-2) gut abgebaut wurde. Das 1-Isomere wurde zwar durch eine Mischpopulation aus der Göttinger Kläranlage ebenfalls als Wachstumssubstrat genutzt, die Isolierung von Reinkulturen scheiterte jedoch an der sehr geringen Wachstumsrate der Bakterien. Die Inkubation der Mischpopulation mit Naphthalindisulfonsäuren erbrachte eine intrazelluläre Akkumulation der 1,5- und 2,7-Isomeren. Nach Lysis der Zellen waren diese wieder in der Kulturflüssigkeit nachweisbar.

Eine Reinkultur des Stammes A 1 wurde durch Selektion in kontinuierlicher Kultur auf Naphthalin-2-sulfonsäure als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle gewonnen. Diese wurde zu Untersuchungen des Katabolismus der Sulfonsäure herangezogen, weil sie sich bei Inkubation mit dem Substrat durch Akkumulation von Metaboliten auszeichnete.

Der mikrobielle Umsatz von Naphthalin wurde von FERNLEY und EVANS (1968) und DAVIES und EVANS (1962, 1964) untersucht. Durch Doppelhydroxylierung wird das Substrat zunächst in ein Dihydrodiol überführt (WALKER und WILTSHIRE, 1953), welches durch Dehydrogenierung in 1,2-Dihydroxynaphthalin überführt wird (PATEL und GIBSON, 1974). Nach Ringöffnung durch extradiol-Spaltung zu cis-o-Hydroxybenzalpyruvat wird das Substrat über Salicylaldehyd zur Salicylsäure weiter umgesetzt (DAVIES und EVANS, 1964). Letztere wurde schon in früheren Jahren als Metabolit des Naphthalinabbaus gefunden (STRAWINSKI und STONE, 1943; WALKER und WILTSHIRE, 1953; STRAWINSKI und STONE, 1954). Sie scheint eine Schlüsselstellung beim mikrobiellen Umsatz von kondensierten Aromaten einzunehmen, da sie z. B. den kompletten Enzymsatz des Naphthalinabbaus induzieren kann (SHAMSUZZAMAN und BARNSLEY, 1974a, 1974b; BARNSLEY, 1975). Salicylsäure wird über Brenzkatechin und dem α-Ketosäureweg dem Totalabbau zugeführt

(DAVIES und EVANS, 1962; 1964).

Durch Isolierung und Charakterisierung der Zwischenprodukte konnte der Abbauweg von NS-2 weitgehend aufgeklärt werden. Der Stamm A 1 eliminiert demnach zunächst die SO_3H-Gruppe als Sulfat; das Spaltprodukt, 2-Hydroxynaphthalin, wird anschließend in den Naphthalin-Abbauweg eingeschleust, wobei wahrscheinlich 1,2-Dihydroxynaphthalin Zwischenprodukt ist (FERNLEY und EVANS, 1958). Bei physiologischem pH in wäßriger Lösung wird die Verbindung zum 1,2-Naphthochinon oxidiert (MURPHY und STONE, 1955; PATEL und GIBSON, 1974). Bei Inkubation von Pseudomonas sp. A 1 mit NS-2 wurden im Chromatogramm des sauren Ätherextraktes der Kulturflüssigkeit mehrere rote und braune Banden gefunden, welche möglicherweise durch Autoxidation und Polymerisation des 1,2-Naphthochinons gebildet wurden. Nach H_2O_2-Behandlung des sauren Ätherextraktes konnte Cumarin isoliert werden, welches durch oxidative Decarboxylierung aus dem Ringspaltungsprodukt (cis-o-Hydroxybenzalpyruvat) darstellbar ist (DAVIES und EVANS, 1964). Die Isolierung von Cumarin, Salicylaldehyd, Salicylsäure und Brenzkatechin aus Kulturflüssigkeiten von Pseudomonas sp. A 1 bei Inkubation mit NS-2 sowie das Vorhandensein der Metapyrokatechase bestätigen den von DAVIES und EVANS (1964) beschriebenen Naphthalin-Abbauweg für diesen Mikroorganismus.

Stamm A 1 verfügt zusätzlich über eine bislang wenig beachtete Variante des Aromatenabbaus via Gentisinsäure. WALKER und LIPPERT (1965) konnten bei Inkubation von 2-Hydroxynaphthalin mit von ihnen isolierten Pseudomonaden Gentisinsäure nachweisen. Sie postulierten den Angriff der Naphthalindoppelhydroxylase am unsubstituierten Ring, was in Analogie zum Naphthalinabbau zur Gentisinsäure führen würde. Pseudomonas sp. A 1 akkumuliert Gentisinsäure auch, wenn er mit Salicylsäure inkubiert wird; sie scheint somit ein Metabolit einer Variante des Salicylsäureabbaus zu sein. Wie die Aktivitäten der Ringspaltungsenzyme Metapyrokatechase und Gentisinsäureoxygenase zeigen, baut dieser Organismus Salicylsäure hauptsächlich über den Gentisinsäureweg ab. YANO und ARIMA (1958) erwähnten den bakteriellen Umsatz

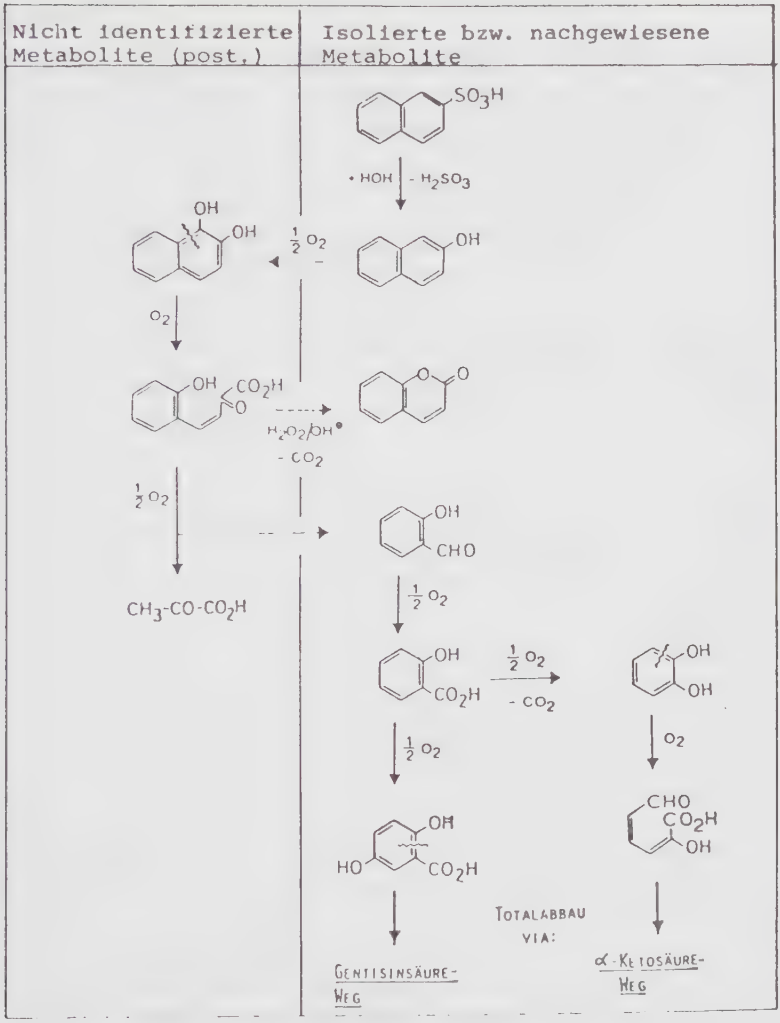
von Salicylsäure via Gentisinsäure bei drei von ihnen isolierten Stämmen, untersuchten diesen Weg aber nicht näher. Als Ringspaltungsenzym wurde die Gentisinsäureoxygenase von SUGIYAMA et al. (1958) und von LACK (1959) beschrieben. Sie ist in beiden Fällen durch m-Hydroxybenzoat induzierbar.

Die Frage, ob der Umsatz von Salicylsäure durch Stamm A 1 via Brenzkatechin oder via Gentisinsäure zwei verschiedene oder eine unspezifische Salicylsäurehydroxylase bedingt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht entschieden werden, weil die Aktivität des Enzyms in zellfreien Extrakten nicht nachweisbar war.

Aufgrund der nachgewiesenen Enzymaktivitäten und isolierten Metabolite, die bis auf 2-Hydroxynaphthalin von NS-2-induzierten Zellen auch veratmet wurden, scheint dieser Organismus den in Schema 3 auf S.93 dargestellten Abbauweg einzuschlagen.

Bei Inkubation des gleichen Substrates mit dem zweiten hier isolierten Bakterium, das nach den Kriterien von STANIER et al. (1966) als Pseudomonas testosteroni identifiziert wurde, ist in der Kulturflüssigkeit nur Salicyl- und Gentisinsäure nachweisbar. Die Sauerstoffaufnahme bei Inkubation mit 2-Hydroxynaphthalin, Naphthalin, Cumarin, Salicylaldehyd, Salicylsäure und Gentisinsäure durch NS-2-induzierte Zellen machen auch hier den in Schema 3 angegebenen Abbauweg der Sulfonsäure wahrscheinlich. Wie Messungen mit zellfreien Extrakten jedoch zeigten, baut dieser Organismus Salicylsäure nur über Gentisinsäure ab.

Das den Katabolismus von NS-2 einleitende Enzym ist bei P.testosteroni A 3 im Gegensatz zum Stamm A 1 neben Naphthalin auch durch Salicylsäure induzierbar. Darüberhinaus hemmt Naphthalin den Umsatz der Sulfonsäure völlig, jedoch reversibel. Aus den Hemmkinetiken geht weiter hervor, daß das Enzym ausreichend unspezifisch ist, neben 2-Hydroxynaphthalin auch Naphthalin-2-carbonsäure (NC-2) umzusetzen. Durch reversible Hemmbarkeit dieses Umsatzes durch NS-2 ist außer Frage gestellt, daß es sich um die Aktivität desselben Enzyms handelt. Für die relativen

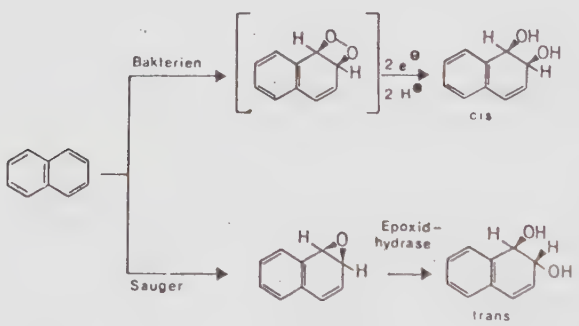


Schema 3 Postulierter Abbauweg der Naphthalin-2-sulfonsäure durch Pseudomonas sp. A 1

Von den im Schema aufgeführten Metaboliten konnten 2-Hydroxynaphthalin, Salicylaldehyd, Salicylsäure, Gentisinsäure und Brenzkatechin in Ätherextrakten von Kulturflüssigkeiten nachgewiesen werden. Die Isolierung von Cumarin nach H_2O_2-Behandlung (⋯►) der Extrakte machte cis-o-Hydroxybenzalpyruvat als Ringspaltungsprodukt des 1,2-Dihydroxynaphthalins wahrscheinlich. Von den am Abbau beteiligten Enzymen konnten Metapyrokatechase und Gentisinsäureoxygenase nachgewiesen werden.

Affinitäten läßt sich die Reihe Naphthalin > 2-Hydroxynaphthalin ~ NS-2 > NC-2 aufstellen und für die relativen Umsatzgeschwindigkeiten gilt: Naphthalin ~ 2-Hydroxynaphthalin > NS-2 > NC-2. Die offensichtlich hohe Affinität des Enzyms zum unsubstituierten Aromaten und dessen hohe Umsatzgeschwindigkeit zeigt, daß die eigentliche, d. h. natürliche Funktion in der Doppelhydroxylierung des Naphthalins zu sehen ist.

Für eine solche Doppelhydroxylierung geben JERINA et al. (1971) folgendes Schema an:



Bei Säugern führt der Angriff einer Monooxygenase unter Einbau eines O_2-Atoms (Oxen) zu einem Epoxid (JERINA et al., 1970a, 1974; DALY et al., 1972), das durch eine Epoxidhydrase in trans-1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin überführt wird (JERINA et al., 1968, 1970b). Beim bakteriellen Abbau hingegen werden beide Atome des Luftsauerstoffs - wie GIBSON et al. (1970b) am Beispiel des Benzols zeigen konnten - in den aromatischen Ring eingeführt. Als erstes Oxidationsprodukt einer Dioxygenase wird dabei ein cyclisches Peroxid (1,2-Dioxetan) postuliert (GIBSON, 1971), wobei die cis-Konfiguration der O-Atome fixiert ist. Die nachfolgende hydrogenolytische Öffnung des Dioxetanringes liefert cis-konfigurierte 1,2-Diole.

Frühere Arbeiten berichteten von trans-Metaboliten beim Abbau von Naphthalin durch Mikroorganismen (WALKER und WILTSHIRE, 1953, 1955; TRECCANI et al., 1954; GRIFFITHS et al., 1965). Über die Beobachtungen der Autoren urteilten JEFFREY et al. (1975): „only small samples were available for study, and rigorous assignment of stereochemistry was not possible".

Die Isolierung der Dihydrodiole und die Aufklärung der relativen Konfiguration ihrer Hydroxylgruppen liefern wichtige Hinweise auf den Oxygenierungsmechanismus. Beim Abbau von Naphthalin durch Pseudomonas testosteroni A 3 wird 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin sofort durch die entsprechende Dehydrogenase weiter abgebaut. Im Falle des NS-2- und 2-Hydroxynaphthalin-Umsatzes wird wahrscheinlich der Dehydrogenierungsschritt umgangen, weil HSO_3^- bzw. OH^- aus den entsprechenden Dihydrodiolen nichtenzymatisch abgespalten wird. Die Akkumulation eines solchen Metaboliten gelingt, wenn das Dihydrodiol aufgrund von Enzymspezifität nicht weiter umgesetzt und der Substituent nicht wie im Falle der SO_3H- bzw. OH-Gruppe unter Mitnahme des Elektronenpaares eliminiert werden kann.

Der Einsatz der strukturanalogen, nicht isoelektronischen Naphthalin-2-carbonsäure durch P. testosteroni A 3 führte zur gewünschten Anhäufung des Oxygenierungsproduktes. Es zeigte sich, daß die Zellen beim Umsatz der Carbonsäure sehr schnell an Aktivität verloren. Dieser Verlust kann durch konstitutiv verwertbare Substrate, wie Malat und Succinat verlangsamt werden. Möglicherweise gleichen diese den bei der Oxygenierung auftretenden NADH-Verlust teilweise aus, was beim Umsatz von Naphthalin durch die Wirkung der 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-Dehydrogenase geschieht.

Mit dem Oxygenierungsprodukt der NC-2 ist eine neue, bisher in der Literatur noch nicht beschriebene Verbindung isoliert worden. Aus NMR-Daten und dem Produkt der säurekatalysierten Rearomatisierung sowie dem Massenspektrum geht eindeutig hervor, daß es sich beim vorliegenden Metaboliten um 1,2-Dihydoxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure handelt.

4.2. Zur Stereochemie der 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure

Wertvolle Hinweise auf den Mechanismus der Naphthalinoxygenierung kann die Aufklärung der relativen Konfiguration der Hydroxylgruppen der akkumulierten 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure liefern. Eine stereochemische Analyse dieses Dihydrodiols und verwandter vom Benzoat abgeleiteter Verbindungen (REINER und HEGEMAN, 1971; REINEKE, 1976) ist jedoch nicht einfach durchzuführen, da nur ein Isomeres zur Verfügung steht. Methoden, mit welchen die Reaktionsgeschwindigkeiten der Glykolspaltung oder die säurekatalysierte Rearomatisierung sowie die Farbreaktion mit Na-Acetylosmat verglichen werden, können nur dann Hinweise auf die Konfiguration liefern, wenn cis- und trans-Isomere verfügbar sind. Die Ozonolyse von 2,3-Dihydroxy-2,3-dihydrobenzoat führt zur Weinsäure, wodurch die Bestimmung der absoluten Konfiguration der Glykolgruppierung ermöglicht wird (YOUNG und GIBSON, 1969). Im vorliegenden Fall ist diese Methode jedoch nicht anwendbar, weil sie zu Produkten führen würde, für welche keine Referenzsubstanzen erhältlich sind. Die stereochemische Analyse der Dihydrodiole mit Hilfe der NMR-Spektroskopie (JERINA et al., 1971) ist für 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure ebenfalls nicht durchführbar, da durch Ersatz eines Protons am asymmetrischen C2-Atom durch eine Carboxylgruppe eine Kopplungsaufspaltung vicinaler Protonen nicht auftreten kann.

Hinweise auf die Konfiguration des in dieser Arbeit isolierten Dihydrodiols lieferte die IR-Spektroskopie sowie die Verbrückung der Hydroxylgruppen mit 2,2-Dimethoxypropan. Im folgenden soll zum Verständnis beider Methoden zunächst die Stereochemie der Verbindung diskutiert werden.

Die Hydroxylgruppen der 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-

2-carbonsäure können cis- oder transständig sein; von beiden Stellungsisomeren sind je zwei Enantiomere, von letzteren schließlich je zwei Konformere möglich, was am Beispiel der cis-1(S),2(R)-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure am Dreiding-Stereomodell gezeigt werden soll (Abb. 23).

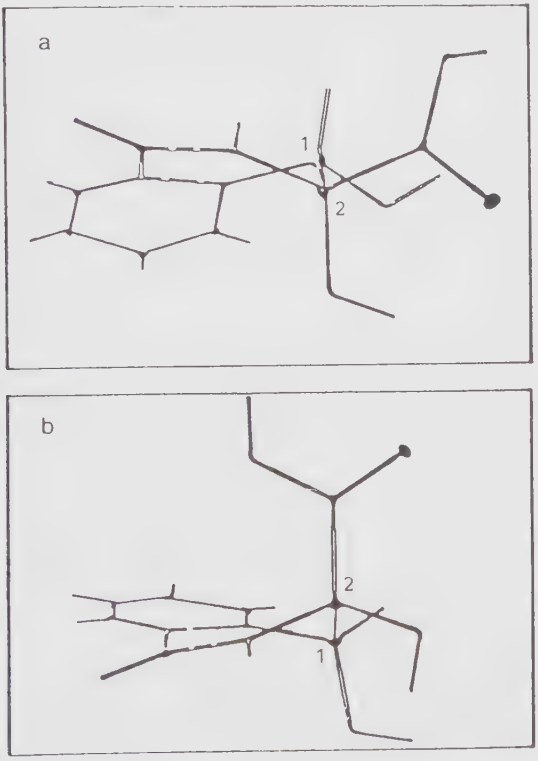


Abb. 23 Konformationsisomere der cis-1(S),2(R)-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure

Dargestellt ist das Dreiding-Stereomodell des als Beispiel gegewählten Enantiomeren. Der Blick ist auf das C2-Atom gerichtet, das sich in a unter und in b über der Ebene des unsubstituierten Ringes befindet; a ist durch Klappen in b überführbar.

Die Wiedergabe der Konformeren verdeutlicht, daß eine Hydroxylgruppe stets äquatorial und eine axial stehen muß. Entsprechendes gilt für das Konformerenpaar der cis-1(R),1(S)-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure (über die Anwendung des RS-Systems, vgl. CAHN et al., 1956). Bei den trans-Isomeren hingegen stehen beide OH-Gruppen äquatorial oder axial. Eine übersichtlichere Darstellung der beiden Konformere liefert die Vereinfachung der Newman-Projektion (NEWMAN, 1955), wobei das Molekül längs der Achse C2 (das die Carboxylgruppe tragende Atom) nach C1 (als Kreis dargestellt) betrachtet wird.

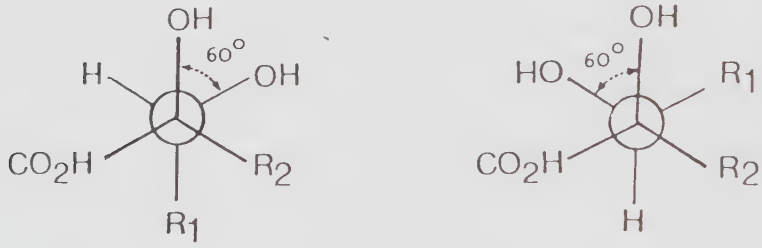


Abb. 24 Newman-Projektionen der cis-1(S),2(R)-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure

Dargestellt sind die zwei Konformere der Abb. 23. R_1 und R_2 sind über ein konjugiertes Diensystem miteinander verknüpft. Beim Überführen von a in b wurde die Lage von C2 nicht verändert.

Wie aus Abb. 24 ersichtlich ist, wird beim Übergang der beiden Konformere ineinander die synperiplanare Anordnung der Hydroxylgruppen durchlaufen, was beim trans-Glykol nicht möglich ist (Abb. 25).

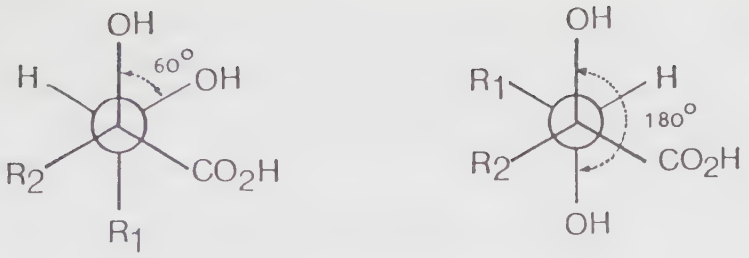


Abb. 25 Newman-Projektionen der trans-1(S),2(S)-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure

Erläuterungen s. Abb. 24

Im Gegensatz zum cis-Glykol kann das trans-Isomere beim Übergang der beiden Konformere ineinander nur zur antiperiplanaren Konformation durchklappen, d. h. der Winkel zwischen den beiden OH-Bindungen wird nie kleiner als 60°, womit die Reaktionsfähigkeit der Hydroxylgruppen eingeschränkt wird. Die Derivatisierung mit 2,2-Dimethoxypropan zum Acetonid ist eine für cis-Cyclohexadien-1,2-diole typische Reaktion (GIBSON et al., 1974). Schon der Versuch, mit Dreiding-Stereomodellen einen 1,3-Dioxolanring vom trans-Isomeren zu konstruieren, scheitert, da die Verdrillung des Fünfringes zu groß wäre. BÖESEKEN (1923) untersuchte den Einfluß von Cyclohexan-1,2-diolen auf die elektrische Leitfähigkeit von Borsäurelösungen. Während das cis-Diol mit der Säure einen anionischen Komplex bildet und so die Leitfähigkeit erhöht, hat das trans-Isomere nur äußerst geringen Einfluß. Der gleiche Autor erhielt aus cis-Cyclohexan-1,2-diol ein Acetonid, welches vom trans-Diol nicht herstellbar war.

KUHN (1952, 1954, 1958) und COLE et al. (1959) berichteten, daß ein vic-Glykol im Infrarotspektrum durch zwei OH-Absorptionsschwingungen bei 3000 cm^{-1} ausgezeichnet ist. Sie werden von einer freien und einer intramolekular gebundenen Hydroxylgruppe hervorgerufen. Der Unterschied ($\Delta\nu$) zwischen beiden Banden wird umso größer, je stärker die Wasserstoffbrückenbindung zwischen

beiden OH-Gruppen ist. Die beobachteten Δν-Werte liefern somit ein Maß für den Abstand der O-Atome voneinander, woraus durch trigonometrische Berechnungen der Winkel zwischen den Bindungen gewonnen werden kann. Vom cis- und trans-Isomeren des Cyclohexan-1,2-diols wurden Δν-Werte von 38 cm^{-1} bzw. 32 cm^{-1} ermittelt, entsprechend den Winkeln 50° bzw. 60°. Im Falle der 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure beträgt Δν = 60 cm^{-1}. Dieser Wert ist mit Δν = 61 cm^{-1} des cis-Cyclopentan-1,2-diols vergleichbar (KUHN, 1954) und entspricht einem Winkel von ca. 0°, woraus die synperiplanare Konformation folgt und damit die cis-Konfiguration. Für die entsprechende Vergleichssubstanz ohne Carboxylgruppe (cis-1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin) liegt bislang kein IR-Spektrum in CCl_4 vor. Das trans-Isomere jedoch liefert entsprechend der nach der Theorie fehlenden Assoziationsschwingung nur eine OH-Absorptionsbande bei 3608 cm^{-1} (KUHN, 1952).

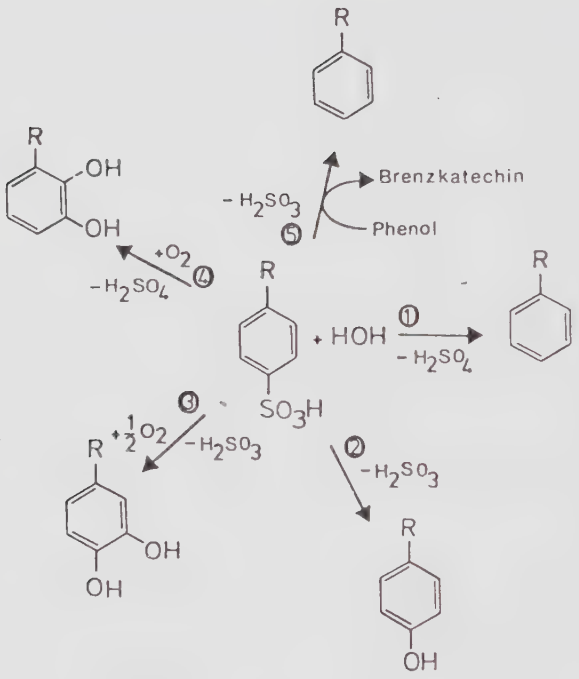
Der gleiche Autor ermittelte 1954 von einer Reihe cyclischer 1,2-Diole mit unterschiedlicher C-Anzahl im Ring die Δν-Werte und versuchte, sie zur Acetonid-Bildung in Beziehung zu setzen. Er fand, daß Glykole mit Δν > 36 cm^{-1} Isopropylidenderivate liefern, solche mit Δν < 34 cm^{-1} dagegen nicht.Bei dem isolierten 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäuremethylester war daher (Δν = 60 cm^{-1}) die Bildung eines Acetonids zu erwarten. Die Reaktion läuft 6mal langsamer als die bei JEFFREY et al.(1975) beschriebene Derivatisierung des cis-1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalins ab, liefert aber dennoch das kristalline Acetonid in hohen Ausbeuten. Die herabgesetzte Bildungsgeschwindigkeit dürfte auf sterische Hinderung durch die Carboxymethylgruppe zurückzuführen sein. JEFFREY et al. (1975) berichteten ferner, daß das trans-Isomere der von ihnen untersuchten Verbindung mit 2,2-Dimethoxypropan nicht reagierte. Die Daten der IR-Spektroskopie sowie die leichte Derivatisierbarkeit zum Acetonid machen die cis-Konfiguration der Hydroxylgruppen im Oxy-

generierungsprodukt der Naphthalin-2-carbonsäure wahrscheinlich. Einen Beweis für die cis-Konfiguration von 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure sowie die Bestimmung der absoluten Konfiguration der Glykolgruppierung kann nur die kristallographische Röntgenstrukturanalyse liefern.

4.3. Heterolyse der Kohlenstoff-Schwefel-Bindung

Die Heterolyse der Kohlenstoff-Schwefel-Bindung der sulfonierten Naphthaline ist chemisch auf zwei Wegen zu erreichen. Technisch bedeutsam ist die Alkalischmelze dieser Verbindungen (Weg a), die bei hohen Temperaturen neben Sulfit die entsprechenden Naphthole liefert. Ebenfalls hohe Temperaturen und eine zusätzliche Säurekatalyse sind Vorraussetzungen für die unter diesen Bedingungen reversible aromatische Sulfonierung (Weg b), deren Produkte Naphthalin und Sulfat sind.

Bisher wurde die Desulfonierung von aromatischen Sulfonsäuren durch Mikroorganismen nur im Rahmen der Abbaubarkeit von Alkylmonobenzolsulfonsäuren (LAS und ABS) untersucht. Der Abbau des Aromaten wird demnach stets durch die Eliminierung der SO_3H-Gruppe eingeleitet. Eine Übersicht der wichtigsten Desulfonierungsreaktionen gibt Schema 4.



Schema 4 Desulfonierungsmechanismen bei verschiedenen Arylsulfonsäuren verwertenden Bakterien

Die aufgenommenen Beispiele beschreiben die Abspaltung von SO_3H-Gruppen beim biologischen Abbau von Alkylbenzolsulfonaten (R^3= Alkyl). Die dargestellten Desulfonierungsmechanismen wurden bei folgenden Mikroorganismen gefunden:

① Cladosporium resinae (WILLETTS, 1973)

② Bacillus sp. (WILLETTS und CAIN, 1972)

③ P. aeruginosa (CAIN und FARR, 1968) und Alcaligenes sp. (BIRD und CAIN, 1974)

④ Pseudomonas sp. (FOCHT und WILLIAMS, 1970)

⑤ Pseudomonas sp. (HORVATH und KOFT, 1972)

Die Varianten ① und ② der Desulfonierung (Schema 4) sind chemisch, allerdings nur unter drastischen Bedingungen (s. o.), durchführbar. Bei dem von Cladosporium resinae verwirklichten Weg ① (WILLETTS, 1973) wird die Sulfonsäure hydrolytisch in Aren und Sulfat gespalten. Die Reaktion entspräche der Möglichkeit b auf S. 101. Die andere chemisch mögliche Variante der SO_3H-Eliminierung (Möglichkeit a auf S. 101) wird von Bacillus sp. beschritten (WILLETTS und CAIN, 1972; Weg ② in Schema 4). Das Bakterium desulfoniert p-Undecyl- und p-Dodecylbenzolsulfonsäure zu den entsprechenden Phenolen unter Sulfit-Eliminierung. Die Desulfonierungsenzyme der Wege ① und ② in Schema 4 wurden von den Autoren als stabil beschrieben. Eine nähere Untersuchung wurde angekündigt, liegt aber bislang noch nicht vor. BIRD und CAIN (1974) wiesen als Desulfonierungsprodukte von p-Äthyl-, p-Propyl- und p-Isopropylbenzolsulfonat durch Alcaligenes sp. die entsprechenden Alkylbrenzkatechine und Sulfit nach (Weg ③ in Schema 4). Analog fanden CAIN und FARR (1966, 1968) beim Umsatz von p-Toluolsulfonsäure durch Pseudomonas aeruginosa 4-Methylbrenzkatechin und HSO_3^-. Das diese Reaktion katalysierende Enzym wurde als NAD(P)H-abhängig beschrieben und lieferte unter O_2-Aufnahme und Sulfitproduktion beim Umsatz von Benzolsulfonsäure Brenzkatechin. Es war jedoch in zellfreien Extrakten labil, reproduzierbare Ergebnisse konnten deshalb nicht erhalten werden. FOCHT und WILLIAMS (1970) berichteten dagegen, daß ihr Pseudomonas sp. p-Toluolsulfonsäure zu 3-Methylbrenzkatechin und Sulfat spaltet (Weg ④ in Schema 4). Durch Isotopenmarkierung fanden die Autoren in den Zellen zwei ^{35}S-Zwischenprodukte, die allerdings nicht identifiziert werden konnten. Sie postulierten, daß es sich dabei um ein sulfoniertes 3-Methyl-1,2-dihydroxy-1,2-dihydrobenzol und um das durch eine Dehydrogenase gebildete entsprechende Brenzkatechinderivat handelt. In der Kulturflüssigkeit konnte nur 3-Methylbrenzkatechin und $^{35}SO_4^{2-}$ gefunden werden. Eine Aktivität des desulfonierenden Enzymes war in zellfreien Extrakten nicht nachweisbar. HORVATH und KOFT (1972) fanden beim Wachstum von Pseudomonas sp. mit Glucose Cometabolismus von Alkylbenzolsulfonaten mit verzweigten Seitenketten (ABS). Der Abbau der Sul-

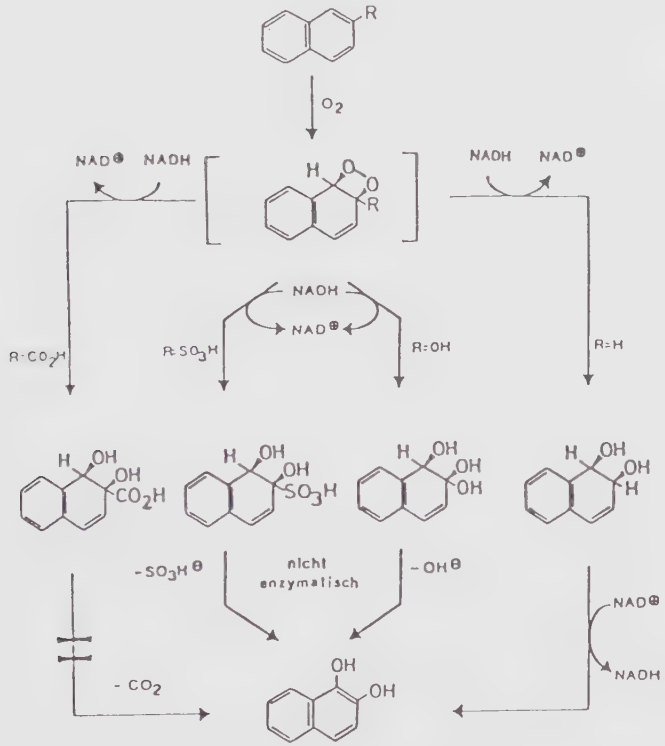
fonsäure setzte erst ein, wenn in diesen Kulturen neben Brenzkatechin Phenol nachweisbar war. Da der Stamm darüberhinaus nur auf Phenol wachsen konnte, wenn ABS zusätzlich vorhanden war, postulierten die Autoren die in Schema 4 wiedergegebene Desulfonierungsreaktion (Weg ⑤).

Der in dieser Arbeit neu isolierte Pseudomonas sp. A 1 desulfoniert NS-2 zu Sulfat und 2-Hydroxynaphthalin. Die oben erwähnte SO_3H-Abspaltung unter Naphtholbildung fördert als zweites Spaltprodukt Sulfit. RIPIN et al. (1971) fanden beim Umsatz von Benzol- und p-Toluolsulfonsäure durch Pseudomonas testosteroni H-8 neben den entsprechenden Phenolen ebenfalls nur Sulfat in der Nährlösung. Sie postulierten, daß dieser Befund auf eine aktive Sulfitoxygenase zurückzuführen ist, die HSO_3^- sofort innerhalb der Zelle in Sulfat überführt, wodurch die Akkumulation von Sulfit verhindert wird.

Das zweite Produkt der Spaltung der Aren-Sulfonsäure-Bindung, 2-Hydroxynaphthalin, scheint von größerer Aussagekraft für den Desulfonierungsmechanismus bei Pseudomonas sp. A 1 zu sein, weil diese Verbindung in größerer Menge aus der Kulturflüssigkeit beim Umsatz von NS-2 extrahierbar war. Wäre 2-Hydroxynaphthalin als Artefakt der Rearomatisierung aus dem Naphthalinmetaboliten 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin hervorgegangen, so müßte gleichzeitig das 1-Isomere als Produkt auftreten. JERINA et al. (1971) fanden nämlich, daß die Rearomatisierung zu über 95 % 1-Hydroxynaphthalin und nur wenig 2-Isomeres liefert. Beim Umsatz von NS-2 durch ruhende Zellen von Pseudomonas sp. A 1 konnte 1-Hydroxynaphthalin nicht nachgewiesen werden, obwohl durch Anwendung der HPLC eine verläßliche und empfindliche Detektionsmethode zur Verfügung stand. Danach eliminiert der Stamm A 1 die SO_3H-Gruppe wahrscheinlich analog Weg ② in Schema 4 als Sulfit und schleust das resultierende Spaltprodukt, 2-Hydroxynaphthalin, in den normalen Naphthalin-Abbauweg ein.

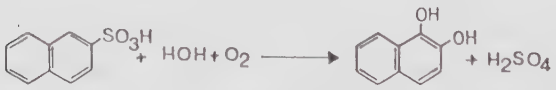
Der zweite in dieser Arbeit isolierte Stamm, Pseudomonas testosteroni A 3, eliminiert die SO_3H-Gruppe oxygenolytisch. Wie

Induktions- und Inhibitionskinetiken zeigten, wird NS-2 mittels einer unspezifischen Naphthalinoxygenase desulfoniert. Das Enzym setzte neben Sulfonsäure und Naphthalin auch 2-Hydroxynaphthalin um. Die Cooxidation eines strukturanalogen, nicht isoelektronischen Substrates (NC-2) führte durch Katalyse des gleichen Enzymes zur Akkumulation von cis-1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure, wodurch der in Schema 5 vorgeschlagene Oxygenierungsmechanismus gestützt wird.



Schema 5 Mechanismus der Oxygenierung von Naphthalin (R = H), 2-Hydroxynaphthalin (R = OH), Naphthalin-2-sulfonsäure (R = SO_3H) und Naphthalin-2-carbonsäure (R = CO_2H) durch eine unspezifische Naphthalinoxygenase aus Pseudomonas testosteroni A 3

Ein sehr überraschendes Ergebnis bei der Strukturaufklärung der akkumulierten cis-1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure war, daß die beiden Sauerstoffatome in 1- und 2-Stellung der NC-2, trotz vorhandenem Substituenten eingeführt worden waren. Polare Gruppen scheinen somit einen dirigierenden Einfluß auf den Angriff der Dioxygenase auszuüben. Warum im vorliegenden Fall das Oxygenierungsprodukt der NC-2 völlig isomerenfrei erhalten wurde, kann bislang nicht erklärt werden. Der Angriff der Naphthalinoxygenase sollte analog bei Naphthalin-2-sulfonsäure als Substrat zur cis-1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-sulfonsäure führen. Diese stellt das Bisulfitadditionsprodukt einer cyclischen Carbonylverbindung dar (Schema 5), aus der spontan - also nichtenzymatisch - Sulfit eliminiert werden kann. Einen vergleichbaren Eliminierungsmechanismus formulierten MILNE et al. (1968) beim Umsatz von o-Fluorbenzoesäure durch Pseudomonas sp. Dabei soll aus 2-Fluor-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäure unter HF-Abspaltung und Decarboxylierung Brenzkatechin gebildet werden. Mittels einer in der Dehydrogenase defekten Mutante, Alcaligenes eutrophus B 9 (JOHNSON und STANIER, 1971), konnte der Mechanismus bestätigt werden. Bei Inkubation von o-Fluorbenzoat akkumulierte diese das oben postulierte Dihydrodiol, aus dem Fluorid eliminiert wird (REINEKE, persönliche Mitteilung). In den aufgeführten Beispielen wird in jedem Fall die Dehydrogenase umgangen. Der dabei auftretende Mangel an Reduktionsäquivalenten kann beim Umsatz der Sulfonsäure durch Oxidation von hypothetisch gefordertem Sulfit zu Sulfat ausgeglichen werden. Das steht mit der Bilanz des Umsatzes im Einklang:



Die hier vorgestellte Desulfonierung von Naphthalin-2-sulfonsäure durch Pseudomonas testosteroni A 3 ist insofern neu, da die Eliminierungsreaktion allein auf der Unspezifität einer Naphthalinoxygenase beruht. Formal ist die Reaktion mit der SO_3H-Eliminierung, beschrieben von CAIN und FARR (1968) und BIRD und CAIN (1974), zu verleichen (Weg ③ in Schema 4). Die von letzteren Autoren untersuchte Alcaligenes sp. konnte jedoch die entsprechenden nichtsulfonierten aromatischen Kohlenwasserstoffe nicht verwerten, was gegen den Angriff einer analogen unspezifischen Benzoloxygenase spricht. Ob der von CAIN und FARR (1968) geschilderten Desulfonierung die Aktivität einer Arendoppelhydroxylase zugrunde liegt, kann nicht entschieden werden, weil über den Umsatz von nichtsulfonierten Substraten durch diese Pseudomonas sp. keine Angaben gemacht wurden. Die Autoren berichteten, daß bei einer wachsenden Kultur Sulfit nur kurzzeitig in geringen Mengen akkumuliert wurde, und bei Beginn der logarithmischen Wachstumsphase sofort wieder verschwand. Wurde Sulfat als Schwefelquelle zugegeben, so konnte weder bei wachsenden noch bei ruhenden Kulturen Sulfit-Ausscheidung beobachtet werden. Eine Begründung wurde von den Autoren nicht gegeben. Die rasche Oxidation von Sulfit zu Sulfat, die NAD(P)H-Abhängigkeit des Desulfonierungsenzymes, das bei der SO_3H-Eliminierung gleichzeitig O_2 aufnimmt und das erste faßbare Spaltprodukt - ein Brenzkatechinderivat - lassen vermuten, daß der von CAIN und FARR (1966, 1968) untersuchte Pseudomonas aeruginosa ähnlich wie der in dieser Arbeit vorgestellte Pseudomonas testosteroni A 3 die Sulfonsäuregruppe eliminiert. FOCHT und WILLIAMS (1970) fanden dem diskutierten Mechanismus entsprechend formal die gleichen Desulfonierungsprodukte (Weg 4 in Schema 4). Die Stellung der Hydroxylgruppen im resultierenden Brenzkatechinderivat spricht jedoch für einen anderen Reaktionsverlauf.

TRECCANI et al. (1954) und MURPHY und STONE (1955) isolierten Pseudomonaden, die nach Induktion mit Naphthalin zusätzlich 1- und 2-Hydroxynaphthalin veratmen konnten. Die Naphthalindoppelhydroxylase aus Pseudomonas testosteroni A 3 setzt ebenfalls 2-Hydroxynaphthalin um. Der in Schema 5 vorgeschlagene Angriff einer Dioxygenase führt dabei unter NADH-Verbrauch formal zur Phenolhydroxylierung. Ein ähnlicher Mechanismus wird für die Oxygenierung von Anthranilsäure zu Brenzkatechin formuliert (KOBAYASHI et al., 1964). Die hohe Empfindlichkeit des Organismus für höhere Naphtholkonzentrationen sowie die Nichtinduzierbarkeit der Abbauenzyme durch dieses Substrat läßt vermuten, daß der Cometabolismus der Verbindung durch die unspezifische Naphthalinoxygenase keine physiologische Bedeutung hat.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Aus Abwasserproben des Belüftungsbeckens der Göttinger Kläranlage wurden nach Anreicherung und Selektion in kontinuierlicher Kultur Mikroorganismen isoliert, die auf Naphthalin-2-sulfonsäure als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen können.

2. Die Störung der Anreicherungskultur durch Protozoen konnte mit Cycloheximid ohne Schädigung der mikrobiellen Mischpopulation zurückgedrängt werden.

3. Naphthalin-1-sulfonsäure wurde zwar durch eine Mischpopulation vollständig abgebaut und verwertet, die Isolierung von Reinkulturen scheiterte jedoch an der sehr geringen Wachstumsrate der Bakterien. Naphthalindisulfonsäuren wurden von dieser Mischkultur langsam aus der Kulturflüssigkeit entfernt, was auf intrazelluläre Akkumulation zurückgeführt wird.

4. Für einen der isolierten Stämme, Pseudomonas sp. A 1, konnte nach den Kriterien von STANIER et al. (1966) keine taxonomische Zuordnung getroffen werden. Nach den gleichen Kriterien konnte ein anderer Naphthalin-2-sulfonsäure-verwertender Stamm (A 3) eindeutig als Pseudomonas testosteroni identifiziert werden.

5. Beim Umsatz von Naphthalin-2-sulfonsäure mit ruhenden Zellen von Pseudomonas sp. A 1 konnten 2-Hydroxynaphthalin, Cumarin, Salicylaldehyd, Salicylsäure, Gentisinsäure und Brenzkatechin aus der Kulturflüssigkeit isoliert und identifiziert werden. Die isolierten Verbindungen wurden mit Ausnahme von 2-Hydroxynaphthalin durch Naphthalin-2-sulfonsäure-induzierte Zellen des Stammes weiter umgesetzt und dürfen als echte Metabolite angesehen werden. Salicylsäure wurde über Brenzkatechin und Gentisinsäure weiter abgebaut. Als Produkt der Metapyrokatechase-Aktivität wurde dabei α-Hydroxy-

muconsäuresemialdehyd nachgewiesen.

6. Beim analogen Umsatz von Naphthalin-2-sulfonsäure durch ruhende Zellen von Pseudomonas testosteroni A 3 wurden Salicyl- und Gentisinsäure als einzige Metabolite isoliert. Erstere wurde ausschließlich über den Gentisinsäureweg abgebaut. Ruhende Zellen konnten ebenso wie Zellen des Stammes A 1 Cumarin, Salicylaldehyd, Salicylsäure und Gentisinsäure oxidieren.

7. Als Spaltprodukte der Desulfonierung von Naphthalin-2-sulfonsäure durch Pseudomonas sp. A 1 wurden 2-Hydroxynaphthalin und Sulfat in der Kulturflüssigkeit nachgewiesen. Die Aktivität der Zellen zeigte hohe Substratspezifität; Naphthalin-1-sulfonsäure wurde nicht meßbar umgesetzt.

8. Pseudomonas testosteroni A 3 konnte neben Naphthalin-2-sulfonsäure auch Naphthalin und 2-Hydroxynaphthalin verwerten. Das den Abbau der Aromaten einleitende Enzym war durch Naphthalin-2-sulfonsäure, Naphthalin und Salicylsäure induzierbar. Durch Inhibitionskinetiken mit ganzen Zellen wurden die relativen Affinitäten verschiedener Substrate zu diesem Enzym ermittelt. Es läßt sich folgende Reihe aufstellen: Naphthalin › 2-Hydroxynaphthalin ~ Naphthalin-2-sulfonsäure › Naphthalin-2-carbonsäure. Für die relativen Umsatzgeschwindigkeiten galt entsprechend: Naphthalin ~ 2-Hydroxynaphthalin › Naphthalin-2-sulfonsäure › Naphthalin-2-carbonsäure. Aufgrund der Hemmkinetiken wird das Enzym als Naphthalinoxygenase bezeichnet.

9. Als strukturanaloges, jedoch nicht isoelektronisches Substrat wurde Naphthalin-2-carbonsäure (NC-2) quantitativ zu 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure cooxidiert. Das dabei akkumulierte Oxygenierungsprodukt der NC-2 wurde isoliert und charakterisiert. Die Derivatisierbarkeit zum

Acetonid und das IR-Spektrum bestätigen die cis-Konfiguration der Hydroxylgruppen dieser Verbindung. Nach spektroskopischen Methoden sowie der Rearomatisierbarkeit zu 1-Hydroxynaphthalin-2-carbonsäure handelt es sich um cis-1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure, eine bislang in der Literatur nicht beschriebene Verbindung. Die Isolierung dieses Metaboliten läßt einen bisher unbekannten Mechanismus der SO_3H-Eliminierung sowie der Phenol-Hydroxylierung erkennen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ALEXANDER, M.
LUSTIGMAN, B. K. 1966 Effect of chemical structure on microbial degradation of substituted benzenes. J. Agr. Food Chem. 14, 410 - 413.

ALEXANDER, M. 1973 Nonbiodegradable and other recalcitrant molecules. Biotech. Bioeng. 15, 611 - 647.

BARNSLEY, E. A. 1975 The induction of the enzymes of naphthalene metabolism in Pseudomonads by salicylate and 2-aminobenzoate. J. Gen. Microbiol. 88, 193 - 196.

BEISENHERZ, G.
BOLZE, H. J.
BÜCHER, T.
CZOK, R.
GARBADE, H. K.
MEYER-ARENDT, E.
PFLEIDERER, G. 1953 Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z. Naturforsch. 8b, 555 - 577.

BERSIN, T. 1950 Die Phytochemie des Schwefels. Advan. Enzymol. 10, 223 - 323.

BERTOLACINI, R. J.
BARNEY, J. E. 1957 Colorimetric determination of sulfate with barium chloranilate. Analyt. Chem. 29, 281 - 283.

BIRD, J. A.
CAIN, R. B. 1974 Microbial degradation of alkylbenzenesulphonates. Metabolism of homologues of short alkyl-chain length by an Alcaligenes sp. Biochem. J. 140, 121 - 134.

BÖESEKEN, J. 1923 Notiz über die Konfiguration der cyclischen 1,2-Diole. Ber. dtsch. chem. Ges. 56, 2409 - 2411.

CAHN, R. S.
INGOLD, C. K.
PRELOG, V. 1956 The specification of asymmetric configuration in organic chemistry. Experientia 12, 81 - 124.

CAIN, R. B.
FARR, D. R. 1966 Oxygenases induced by arylsulfonates and related compounds. in:Biological and chemical aspects of oxygenases. Edt. K. BLOCH u. O. HAYAISHI, Maruzen Co, Ltd, Tokyo.

CAIN, R. B.
FARR, D. R.
1968 Metabolism of arylsulfonates by microorganisms.
Biochem. J. 106, 859 - 877.

CLAISEN, L.
1905 108. Über einige Synthesen unter Anwendung von Natriumamid. III. Einwirkung von Monochloressigester auf Ketone bei Gegenwart von Natriumamid.
Ber. dtsch. chem. Ges. 38, 699-709.

COLE, A. R. H.
MÜLLER, G. T. A.
THORNTON, D. W.
WILLIX, R. L. S.
1959 Infrared spectra of natural products. Part IX. Frequencies and intensities of hydroxyl absorption bands in triterpenoids and similar compounds.
J. Chem. Soc. (London) 1218 - 1222

DAGLEY, S.
STOPHER, D. A.
1959 A new mode of fission of the benzene nucleus by bacteria.
Biochem. J. 73, 16 P.

DAGLEY, S.
EVANS, W. C.
RIBBONS, D. W.
1960 New pathways in the oxidative metabolism of aromatic compounds by micro-organisms.
Nature 188, 560 - 566.

DALY, J. W.
JERINA, D. M.
WITKOP, B.
1972 Arene oxides and the NIH-Shift: The metabolism, toxicity and carcinogenicity of aromatic compounds.
Experientia 28, 1129 - 1149.

DAVIES, J. I.
EVANS, W. C.
1962 Ring fission of the naphthalene nucleus by certain soil Pseudomonads.
Biochem. J. 85, 21 P.

DAVIES, J. I.
EVANS, W. C.
1964 Oxidative metabolism of naphthalene by soil Pseudomonads: The ring-fission mechanism.
Biochem. J. 91, 251 - 261.

DE BOER, T. J.
BACKER, H. J.
1954 A new method for the preparation of diazomethane.
Rec. Trav. Chim. 73, 229 - 234.

EBERLE, S. H.
HOESLE, C.
HOYER, O.
KRÜCKEBERG, C.
1974 Analyse organischer Wasserverunreinigungen, besonders von Ligninsulfonsäure, mittels Differential-Pulspolarographie.
Vom Wasser 43, 359 - 380.

FERNLEY, H. N.
EVANS, W. C. 1958 Oxidative metabolism of polycyclic hydrocarbons by soil Pseudomonads.
Nature 182, 373 - 375.

FIESER, L. F.
FIESER, M. 1967 Reagents for organic synthesis.
Wiley, New York, S. 268.

FIESER, L. F.
FIESER, M. 1968 Organische Chemie.
Verlag Chemie, Weinheim.

FOCHT, D. D.
WILLIAMS, F. D. 1970 The degradation of p-toluenesulfonate by a Pseudomonas.
Can. J. Microbiol. 16, 309 - 316.

GIBSON, D. T.
KOCH, J. R.
KALLIO, R. E. 1968 Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms.
II. Metabolism of halogenated aromatic hydrocarbons.
Biochemistry 7, 3795 - 3802.

GIBSON, D. T.
HENSLEY, M.
YOSHIOKA, T. J.
MABRY, T. J. 1970a Formation of (+)-cis-2,3-dihydroxy-1-methylcyclohexa-4,6-diene from toluene by Pseudomonas putida.
Biochemistry 9, 1626 - 1630.

GIBSON, D. T.
CARDINI, G. E.
MASELES, F. C.
KALLIO, R. E. 1970b Incorporation of oxygen-18 into benzene by Pseudomonas putida.
Biochemistry 9, 1631 - 1635.

GIBSON, D. T. 1971 The microbial oxidation of aromatic hydrocarbons.
Crit. Rev. Microbiol. 1, 199 - 223.

GIBSON, D. T.
MAHADEVAN, V.
DAVEY, J. F. 1974 Bacterial metabolism of para- and meta-xylene:Oxidation of the aromatic ring.
J. Bacteriol. 119, 930 - 936.

GIBSON, D. T.
MAHADEVAN, V.
JERINA, D. M.
YAGI, H.
YEH, H. J. C. 1975 Oxidation of the carcinogens benzo(a)pyrene and benzo(a)anthracene to dihydrodiols by a bacterium.
Science 189, 295 - 297.

GLEDHILL, W. E. 1974 Linear alkylbenzenesulfonate:Biodegradation and aquatic interactions.
Advan. Appl. Microbiol. 17, 265 - 293.

GRIFFITHS, E.
EVANS, W. C.
1965 A cell-free perhydroxylase system from soil Pseudomonads with activity on aromatic hydrocarbons. Biochem. J. 95, 51 P.

HORVATH, R. S.
KOFT, B. W.
1972 Degradation of alkylbenzensulfonate by Pseudomonas species. Appl. Microbiol. 23, 407 - 414.

JEFFREY, A. M.
YEH, H. J. C.
JERINA, D. M.
PATEL, T. R.
DAVEY, J. F.
GIBSON, D. T.
1975 Initial reactions in the oxidation of naphthalene by Pseudomonas putida. Biochemistry 14, 575 - 584.

JERINA, D. M.
DALY, J. W.
WITKOP, B.
ZALTZMAN-NIRENBERG, P.
UDENFIEND, S.
1968 Role of the arene oxide-oxepin system in the metabolism of aromatic substrates. I. In vitro conversion of benzene oxide to a premercapturic acid and a dihydrodiol. Arch. Biochem. Biophys. 128, 176 - 183.

JERINA, D. M.
DALY, J. W.
WITKOP, B.
ZALTZMAN-NIRENBERG, P.
UDENFRIEND, S.
1970a 1,2-Naphthalene oxide as an intermediate in the microsomal hydroxylation of naphthalene. Biochemistry 9, 147 - 156.

JERINA, D. M.
ZIFFER, H.
DALY, J. W.
1970b The role of the arene oxide-oxepin system in the metabolism of aromatic substrates. IV. Stereochemical considerations of dihydrodiol formation and dehydrogenation. J. Am. Chem. Soc. 92, 1056 - 1061.

JERINA, D. M.
DALY, J. W.
JEFFREY, A. M.
GIBSON, D. T.
1971 Cis-1,2-dihydroxy-1,2-dihydronaphthalene:A bacterial metabolite of naphthalene. Arch. Biochem. Biophys. 142, 394 - 396.

JERINA, D. M.
DALY, J. W.
1974 Arene oxides:A new aspect of drug metabolism. Science 185, 573 - 582.

JOHNSON, B. F.
STANIER, R. Y.
1971 Regulation of the β-ketoadipate pathway in Alcaligenes eutrophus. J. Bacteriol. 107, 476 - 485.

KARLSON, P. 1974 Kurzes Lehrbuch der Biochemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

KATAGIRI, M.
MAENO, H.
YAMAMOTO, S.
HAYAISHI, O. 1965 Salicylate hydroxylase, a monooxygenase requiring flavin adenine dinucleotide. II. The mechanism of salicylate hydroxylation to catechol.
J. Biol. Chem. 240, 3414 - 3417.

KING, E. O.
WARD, M. K.
RANEY, D. E. 1954 Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin.
J. Lab. Clin. Med. 44, 301 - 307.

KNACKMUSS, H. J. 1975 Über den Mechanismus der biologischen Persistenz von halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen.
Chemiker-Zeitung 5, 213 - 219.

KOJIMA, Y.
IDATA, N.
HAYAISHI, O. 1961 Metapyrocatechase: A new catechol-cleaving enzyme.
J. Biol. Chem. 236, 2223 - 2228.

KORTE, F.
KLEIN, W. 1971 Aktuelle Probleme der Umweltchemie (1).
Sonderdruck, PHARMA INTERNATIONAL, Verlag G. Braun, Karlsruhe.

KUHN, L. 1952 The hydrogen bond. I. Intra- and intermolecular hydrogen bond in alcohols.
J. Am. Chem. Soc. 74, 2492 - 2499.

KUHN, L. 1954 The hydrogen bond. II. The intramolecular bond in cyclic 1,2-diols.
J. Am. Chem. Soc. 76, 4323 - 4326.

KUHN, L. 1958 The hydrogen bond. III. The effect of the size of substituents upon the length of hydrogen bond in various substituted 1,2-diols.
J. Am. Chem. Soc. 80, 5950 - 5954.

LACK, L. 1959 The enzymic oxidation of gentisic acid.
Biochim. Biophys. Acta 34, 117 - 123.

LA RIVIERE, J. W. M. 1958 On the micribial metabolism of the tartaric isomers.
Thesis, Delft.

LEDERBERG, J.
LEDERBERG, E. M. 1952 Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bacteriol. 63, 399 - 406.

LOWRY, O. H.
ROSEBROUGH, N. J.
FARR, A. L.
RANDALL, R. J. 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 - 275.

MILNE, G. W. A.
GOLDMAN, P.
HOLTZMAN, J. L. 1968 The metabolism of 2-fluorobenzoic acid. II. Studies with $^{18}O_2$. J. Biol. Chem. 243, 5374 - 5376.

MURPHY, J. F.
STONE, R. W. 1955 The bacterial dissimilation of naphthalene. Can. J. Microbiol. 1, 579 - 588.

NEWMAN, M. S. 1955 A notation for the study of certain stereochemical problems. J. Chem. Educ. 32, 344 - 347.

NOZAKI, M.
KAGAMIYAMA, H.
HAYAISHI, O. 1963 Metapyrocatechase. I. Purification, crystallization and some properties. Biochem. Z. 338, 582 - 590.

PACHMAYR, F. 1960 Vorkommen und Bestimmung von Schwefelverbindungen in Mineralwasser. Dissertation, München.

PALLERONI, N. J.
DOUDOROFF, M.
STANIER, R. Y.
SOLANES, R. E.
MANDEL, M. 1970 Taxonomy of the aerobic Pseudomonads: The properties of the Pseudomonas stutzeri group. J. Gen. Microbiol. 60, 215 - 231.

PATEL, T. R.
GIBSON, D. T. 1974 Purification and properties of (+)-cis-Naphthalenedihydrodiol dehydrogenase of Pseudomonas putida. J. Bacteriol. 119, 879 - 888.

PESTKA, S. 1971 Inhibitors of ribosome functions. Ann. Rev. Microbiol. 25, 487 - 562.

PFENNIG, N.
LIPPERT, K. D. 1966 Über das Vitamin B_{12}-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. Arch. Mikrobiol. 55, 245 - 256.

REINEKE, W. 1973 Der Einfluß von Chlorsubstitution auf die Oxigenierung von Benzoat durch Bakterien. Diplomarbeit, Göttingen.

REINEKE, W. 1976 Ursachen des verlangsamten biologischen Abbaus halogenierter aromatischer Kohlenwasserstoffe: Modelluntersuchungen an substituierten Benzoaten und 3,5-Cyclohexadien-1,2-diol-1-carbonsäuren. Dissertation, Göttingen.

REINER, A. M.
HEGEMAN, G. D. 1971 Metabolism of benzoic acid by bacteria:Accumulation of (-)-3,5-cyclohexadien-1,2-diol-1-carboxylic acid by a mutant strain of Alcaligenes eutrophus. Biochemistry 10, 2530 - 2536.

RIPIN, M. J.
NOON, K. F.
COOK, T. M. 1971 Bacterial metabolism of arylsulfonates. 1. Benzenesulfonate as growth substrate for Pseudomonas testosteroni H-8. Appl. Microbiol. 21, 495 - 499.

SCHMIDT, K.
LIAAEN-JENSEN, S.
SCHLEGEL, H. G. 1963 Die Carotinoide der Thiorhodaceae. Arch. Mikrobiol. 46, 117 - 126.

SHAMSUZZAMAN, K. M.
BARNSLEY, E. A. 1974a The regulation of naphthalene metabolism in Pseudomonads. Biochem. Biophys. Res. Comm. 60, 582 - 589.

SHAMSUZZUMAN, K. M.
BARNSLEY, E. A. 1974b The regulation of naphthalene oxygenase in Pseudomonads. J. Gen. Microbiol. 83, 165 - 170.

SISTROM, W. R.
STANIER, R. Y. 1954 The mechanism of formation of β-ketoadipate by bacteria. J. Biol. Chem. 210, 821 - 836.

STANIER, R. Y.
PALLERONI, N. J.
DOUDOROFF, M. 1966 The aerobic Pseudomonads: A taxonomic study. J. Gen. Microbiol. 43, 159 - 271.

STRAWINSKI, R. J.
STONE, R. W. 1943 Conditions governing the oxidation of naphthalene and the chemical analysis of its products. J. Bacteriol. 45, 16.

STRAWINSKI, R. J.
STONE, R. W. 1954 Biological oxidation of naphthalene. Can. J. Microbiol. 1, 206 - 210.

SUGIYAMA, S. I.
YANO, K.
TANAKA, H.
KOMAGATA, K.
ARIMA, K.
1958 Metabolism of aromatic compounds by bacteria. Gentisic acid oxidase and protocatechuic acid oxidase of Pseudomonas ovalis S-5. J. Gen. Appl. Microbiol. 4, 223 - 240.

SWISHER, R. D.
1970 Surfactant biodegradation. Marcel Dekker Inc., New York.

TANIUCHI, H.
HATANAKA, M.
KUNO, S.
HAYAISHI, O.
NAKAJIMA, M
KURIHARA, N.
1964 Enzymic formation of catechol from anthranilic acid. J. Biol. Chem. 239, 2204 - 2211.

TAYLOR, C. D.
WOLFE, R. S.
1974 Structure and methylation of coenzyme M. J. Biol. Chem. 249, 4879 - 4885.

TRECCANI, V.
WALKER, N.
WILTSHIRE, G. H.
1954 The metabolism of naphthalene by soil bacteria. J. Gen. Microbiol. 11, 341 - 348.

TRECCANI, V.
GALLI, E.
CATELANI, D.
SORLINI, C.
1968 Induction of 1,2- and 2,3-diphenol oxygenase in Pseudomonas desmolyticum. Z. Allgem. Mikrobiol. 8, 65 - 69.

WALKER, N.
WILTSHIRE, G. H.
1953 The breakdown of naphthalene by a soil bacterium. J. Gen. Microbiol. 8, 273 - 276.

WALKER, N.
WILTSHIRE, G. H.
1955 The decomposition of 1-chloro- and 1-bromonaphthalene by soil bacteria J. Gen. Microbiol. 12, 478 - 483.

WALKER, N.
LIPPERT, K. D.
1965 Formation of gentisic acid from 2-naphthol by a Pseudomonas. Biochem. J. 95, 5 C.

WHEELIS, M. L.
PALLERONI, N. J.
STANIER, R. Y.
1967 The metabolism of aromatic acids by Pseudomonas testosteroni and Pseudomonas acidovorans. Arch. Mikrobiol. 59, 302 - 314.

WILLETTS, A. J.
CAIN, R. B.
1972 Microbial metabolism of alkylbenzenesulfonates. Bacterial metabolism of undecylbenzene-p-sulfonate and dodecylbenzene-p-sulfonate. Biochem. J. 129, 389 - 402.

WILLETTS, A. J. 1973 Microbial metabolism of alkylbenzene sulphonates. Fungal metabolism of 1-phenylundecane-p-sulphonate and 1-phenyldodecane-p-sulphonate. Antonie van Leeuwenhoek 39, 585 - 597.

WODZINSKI, R. S.
JOHNSON, M. J. 1968 Yields of bacterial cells from hydrocarbons. Appl. Microbiol. 16, 1886 - 1891.

WODZINSKI, R. S.
COYLE, J. E. 1974 Physical state of phenanthrene for utilization by bacteria. Appl. Microbiol. 27, 1081 - 1084.

YAMAMOTO, S.
KATAGIRI, M
MAENO, H.
HAYAISHI, O. 1965 Salicylate hydroxylase, a monooxygenase requiring flavin adenine dinucleotide. I. Purification and general properties. J. Biol. Chem. 240, 3408 - 3413.

YANO, K.
ARIMA, K. 1958 Metabolism of aromatic compounds by bacteria. II. m-Hydroxybenzoic acid hydroxylase A and B; 5-dehydroshikimic acid, a precursor of protocatechuic acid. J. Gen. Appl. Microbiol. 4, 241 - 258.

YOUNG, I. G.
GIBSON, F. 1969 The stereochemistry of intermediates involved in the biosynthesis of 2,3-dihydroxybenzoic acid. Biochim. Biophys. Acta 177, 348 - 350.

YOUNG, I. G.
JACKMAN, L. M.
GIBSON, F. 1969a The isolation, identification and properties of 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoic acid. An intermediate in the biosynthesis of 2,3-dihydroxybenzoic acid. Biochim. Boiphys. Acta 177, 381 - 388.

YOUNG, I. G.
GIBSON, F.
MAC DONALD, C. G. 1969b Enzymic and nonenzymic transformations of chorismic acid and related cyclohexadienes. Biochim. Biophys. Acta 192, 62 - 72-

1966 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchungen. Bestimmung des biochemischen Sauerstoffbedarfs. Fachgruppe Wasserchemie, Weinheim.

Tab. 16 Fließmittelsysteme und Rf-Werte der Dünnschichtchromatographie (DC)

Fließmittelsystem (v/v/v)			Verbindung	Rf
I	Benzol	70	Brenzkatechin	0,28
	Methylenchlorid	10	2-Hydroxynaphthalin	0,41
	Äther	20	Cumarin	0,39
			Salicylaldehyd	0,59
			2-Acetoxynaphthalin	0,61
			Diacetoxybrenzkatechin	0,42
II	Chloroform		Salicylaldehyd	0,61
			2.4-Dinitrophenylhydrazon d. Salicylaldehyds	0,56
			2-Hydroxynaphthalin	0,21
III	Diisopropyläther	200	Salicylsäure	0,88
	Ameisensäure	7	Cumarin	0,63
	Wasser	3	Gentisinsäure	0,73
			DHNC	0,15
IV	Chloroform	80	DHNC-Methylester	0,35
	Aceton	20	Gentisinsäuremethylester	0,54
V	Diisopropyläther		DHNC-Acetonid	0,75

Die Bedingungen der DC dind unter 2.12.2. zusammengefaßt. Die Abkürzung DHNC ist hergeleitet von 1,2-Dihydroxy-1,2-dihydronaphthalin-2-carbonsäure.

Tab. 17 Fließmittelsysteme und Retentionszeiten der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Verbindung	Fließmittel A (%)	Fließmittel B (%)	Druck (kg/cm^2)	Retentionszeit (min)
Naphthalin-1-sulfonsäure	100	-	85	4,8
Naphthalin-2-sulfonsäure				7,1
Brenzkatechin				1,5
2-Hydroxynaphthalin				15
Salicylaldehyd				5,8
Salicylsäure				5,7
Gentisinsäure				3,1
2-Hydroxynaphthalin	50	50	120	10
Naphthalin-2-sulfonsäure				4
Naphthalin-2-carbonsäure	10	90	180	4,9
1,2-Dihydroxy-1,2-dihydro-naphthalin-2-carbonsäure				1,9

Die Versuchsbedingungen der HPLC sind unter 2.12.1. aufgeführt. Fließmittel A bestand aus 0,01 M H_3PO_4 + 1 % Propanol-2 und Fließmittel B aus 50 % A + 50 % Methanol.

Meinem Lehrer, Herrn Professor Dr. H. J. Knackmuss, danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit, für sein reges Interesse an ihrem Fortgang und die mir stets gewährte Unterstützung.

Herrn Professor Dr. H. Lackner vom Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen sowie Herrn Dr. W. Otting vom Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg, danke ich für die Aufnahme von NMR- bzw. Massenspektren.

Ferner danke ich allen, die mir bei der Anfertigung meiner Arbeit in irgendeiner Weise behilflich waren.

Lebenslauf

Am 30. August 1944 wurde ich in Clausthal-Zellerfeld (Harz) geboren. Nach 4 Jahren Grundschule besuchte ich das Gymnasium und machte im Februar 1965 das Abitur am mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig der Robert-Koch-Schule in Clausthal-Zellerfeld. Im gleichen Jahr trat ich - als Wehrpflichtiger - in die Bundeswehr ein, die ich 1967 verließ. Im Wintersemester des gleichen Jahres begann ich das Studium der Chemie an der Technischen Universität Clausthal, wo ich im Juli 1970 die Vorprüfung ablegte. Nach der Immatrikulation an der Georg-August-Universität zu Göttingen arbeitete ich ab März 1972 bis November des gleichen Jahres an den Experimenten zur Diplomarbeit mit dem Titel: „Untersuchungen zur Struktur des Nicotinblaus aus Arthrobacter oxidans" am Institut für Mikrobiologie. Die Diplom-Hauptprüfung in organischer Chemie als Hauptfach und physikalischer sowie anorganischer Chemie als Nebenfächer legte ich im Mai 1973 ab. Im August des gleichen Jahres begann ich mit der experimentellen Arbeit zur vorliegenden Dissertation.